

SPLICING MITOCHONDRIALER RNA
BEI SACCHAROMYCES CEREVISIAE:
BESTIMMUNG FUNKTIONELLER
DOMÄNEN IN DER GEFALTETEN RNA
VON GRUPPE I-INTRONS

Jürgen Zimmermann

Diss
München
1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0070

SPLICING MITOCHONDRIALER RNA BEI SACCHAROMYCES CEREVISIAE:
BESTIMMUNG FUNKTIONELLER DOMANEN IN DER GEFALTETEN RNA VON
GRUPPE I-INTRONS

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Jürgen Zimmermann

Januar 1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Schweyen

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 17.3.1986

INHALISVERZEICHNIS

I. Zusammenfassung	1
II. Einleitung	3
III. Material und Methoden	20
1. Abkürzungen	20
2. Feinchemikalien	21
3. Enzyme	22
4. Radiochemikalien	22
5. Sonstiges	22
6. Genetische Bezeichnungen und Abkürzungen	23
7. Stämme	24
8. Medien und Puffer	25
9. Biochemische Methoden	26
9.1 Züchtung von Hefezellen und Isolierung von mtDNA	26
9.2 Restriktion, Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	27
9.3 Die Bestimmung der DNA-Konzentration	28
9.4 Radioaktive Markierung von DNA	28
9.4.1 Nicktranslation von DNA	28
9.4.2 5'-Endmarkierung mit Polynukleotidkinase	28
9.4.3 3'-Endmarkierung mit DNA-Polymerase	28
9.4.4 Markierung von in M13 ligierten Fragmenten	28
9.5 Southern-Analyse von mtDNA	29
9.6 Klonierung von mtDNA in E.coli	29
9.6.1 Ligation der Restriktionsfragmente in pBR 322	29
9.6.2 Transformation von E.coli 490recA ⁻	29
9.7 Präparation von Plasmid-DNA aus E.coli	30
9.8 Klonierung von mtDNA in M13	31

9.9	DNA-Sequenzanalyse	31
9.9.1	Methode nach Maxam-Gilbert	31
9.9.2	Dideoxy-Methode nach Sanger	32
9.9.2.1	Präparation von template-DNA	32
9.9.2.2	Hybridisierung von Primer-DNA an das template	32
9.9.2.3	Sequenzierungsreaktionen und Sequenzgellauf	32
9.10	Verkürzung von in M13 klonierten Fragmenten mit Exonuklease III	33
10.	<u>Genetische Methoden</u>	34
10.1	Induktion und Isolierungen von Revertanten	34
10.1.1	MnCl ₂ -Behandlung	34
10.1.2	MMS-Behandlung	34
10.2	EB-Behandlung der Revertanten	35
10.3	Rekombinationskreuzung	35
10.4	Umkreuzung mit der Kernfusionsmutante IC8/AA1	35
10.5	rho ⁻ -Deletionskartierung	36
10.6	Tetradenanalyse	36
10.7	Random-spore-Analyse	36
IV.	<u>Ergebnisse</u>	37
1.	Intron 4	38
1.1	Cis-acting Mutationen in Intron 4	38
1.2	Revertanten von box9-Mutanten	39
1.3	Das Modell der Intron-Sekundärstruktur	46
1.4	Isolierung von Revertanten der Mutante G2590	48
1.5	Kartierung der Suppressormutation	52
1.6	Bestimmung der Nukleotidsequenz von bI4 in der Revertante RAS	53
1.7	Modifiziertes Modell der bI4-Sekundärstruktur	55

2.	Intron 2	58
2.1	Sequenzierung des 5'-Teils von Intron 2 im Stamm 777-3A	59
2.2	Kartierung der Mutation M561	60
2.3	Sequenzanalyse von M561	63
2.4	Sekundärstruktur von bI2	64
2.4.1	Prinzipien des Aufbaus der Struktur	64
2.4.2	Details der Sekundärstruktur von bI2	66
3.	Intron 3	70
3.1	Nukleotidsequenz von <i>ggb</i> Intron 3	71
3.2	Vergleich von Hefe <i>ggb</i> -Intron 3 mit dem einzigen Intron in <i>ggb</i> bei <i>Aspergillus nidulans</i>	75
3.3	Sekundärstruktur von bI3	77
3.4	Sequenzänderungen in 4 cis-dominanten bI3-Mutationen	80
3.5	Revertanten der box10-Mutante M811	81
4.	GC-Cluster	82
4.1	GC-Cluster als mobile Elemente	82
4.2	Strategie zur schnellen Identifikation der Anzahl der GC-Cluster in bI3 in 12 verschiedenen Stämmen	85
4.3	Ergebnis der Southern Hybridisierung mit 12 Stämmen	89
4.4	Nukleotidsequenz des 2fach-Clusters im Stamm D8-25A	91

V. Diskussion	94
1. Sekundärstruktur der Gruppe I Introns	94
1.1 Kompensatorische Mutationen	94
1.2 Das Sekundärstrukturmodell	97
2. Mögliche Hybride im cob Intron 2	106
3. Identifizierung einer nicht-hybriden Sequenz als Teil eines Spleiß-Signals	110
4. Proteine und RNA-Spleißen	111
5. GC-Cluster in Intron 3	118
VI. Literaturverzeichnis	124

I. Zusammenfassung

Intramolekulare Faltung von Intron-RNA ist eine wesentliche Voraussetzung für die Excision von Introns aus Vorstufen der mRNA, rRNA und tRNA in Zellorganellen von Pilzen und Pflanzen. In der vorliegenden Arbeit wird das Prinzip derartiger Faltung durch das Studium von Mutanten im Intron 4 des cob-Genes der Hefemitochondrien nachgewiesen.

Ausgangspunkt sind cob⁻-Mutanten, die aufgrund von cis-dominanten Punktmutationen an zwei Positionen, box9 und box2 (oder E und S), im Intron 4 des cob-Genes spleißdefekt sind.

Von zwei derartigen Mutanten wurden spleißkompetente Revertanten isoliert, die sich als Doppelmutanten cob^{sup} erwiesen. Die Wirkung der primären cob⁻-Mutation (in E oder S) wurde durch sekundäre Mutation an anderer Position kompensiert.

DNA-Sequenzierung an Mutanten und Revertanten zeigte, daß cob⁻- und sup⁻-Mutationen kompensatorische Basenaustausche in potentiellen Hybriden der Intron-RNA sind. Die primären cob⁻-Mutationen stören eine Basenpaarung in den Hybridbereichen E/E' oder R/S, während die sekundären sup⁻-Mutationen als kompensatorische Basenaustausche die Paarungen wieder stabilisieren und somit offensichtlich die Bildung der Hybride wieder ermöglichen:

E	--3' ACACG ⁵ '--	--3' ACACA ⁵ '--	--3' ACACA ⁵ '--
E'	--3' UGUGC ³ '--	--3' UGUGC ³ '--	--3' UGUGU ³ '--
	Wildtyp	Mutante	Revertante
R	--3' UAGUC ³ '--	--3' UAAUC ³ '--	--3' UAAUC ³ '--
S	--3' AUCAG ³ '--	--3' AUCAG ³ '--	--3' AUUAG ³ '--
	Wildtyp	Mutante	Revertante

Vergleichende Computeranalysen vieler Intronsequenzen durch andere Arbeitsgruppen haben die Existenz einer größeren Zahl von Intron RNA-Hybridbereichen mit partiell konservierter Sequenz postuliert, u.a. auch die Hybride E/E' und R/S. Die Synthese dieser theoretischen Studien und der hier vorliegenden genetischen Ergebnisse führt zu einem Sekundärstrukturmodell, das auf zahlreiche (sog. Gruppe I-) Introns anwendbar ist.

Cob Intron 2, dessen Nukleotidsequenz hier vervollständigt wurde, stellt einen varianten Typ der Gruppe I-Introns dar, insofern als es einer Untergruppe mit charakteristischen Abweichungen vom Standardtyp zugerechnet werden muß und die ansonsten konservierten Bereiche P/Q und R/S kaum Übereinstimmung mit den Konsensussequenzen zeigen. Eine cis-dominante Mutation in b12 wurde sequenziert. Die Lokalisation dieser und weiterer cis-dominanter Mutationen innerhalb des Sekundärstrukturmodells ergab Hinweise auf die Bedeutung bislang nicht als wichtig erkannter Strukturen der Intron-RNA.

Cob Intron 3 wurde vollständig sequenziert. Es weist alle Strukturmerkmale der Gruppe I-Introns auf. Vier cis-dominante

Mutationen in diesem Intron erwiesen sich als +1bp Insertion oder -1bp Deletionen im gleichen Bereich, einer einzelsträngigen Sequenz, die zusammen mit dem angrenzenden Hybrid P/Q in Gruppe I-Introns konserviert ist. Diese Befunde werden dahingehend gedeutet, daß die Mutationen nicht die Faltung der RNA, sondern die Interaktion der gefalteten Intron-RNA mit einer anderen, für das Spleißen wesentlichen Komponente (Protein oder RNA) betreffen. Diese Vermutung wird durch den Nachweis einer Suppressormutation im Zellkern gestützt, die den Spleißdefekt einer der bI3 Mutanten kompensiert.

Bei Sequenzierung von bI3 wurde im 3'-Teil dieses Introns eine Serie von 3 sog. GC-Clustern gefunden. Vergleichende Untersuchungen dieses Bereichs in anderen Stämmen von *S.cerevisiae* zeigen, daß zumindest eines dieser GC-Cluster als optional angesehen werden kann. Dies ist ein Beispiel dafür, daß Variationen der Sequenz durch Insertion/Deletion von DNA-Elementen in Bereichen, die für die RNA-Sekundärstruktur nicht für wesentlich erachtet werden, die Intronexcision nicht beeinträchtigen. Der Vergleich der Sequenzen in 2 Stämmen mit bzw. ohne das optionale Cluster bestärkt die Hypothese, daß GC-Cluster eine charakteristische "target-site" (5'GAT 3') als Integrationsstelle benutzen.

II. Einleitung

RNA-Processing beinhaltet eine Fülle von enzymatischen Reaktionen, welche das Primärtranskript verändern und schließlich die "reife" RNA entstehen lassen. Diese Veränderungen des Primärtranskriptes sind unterschiedlich, je nach Organismus (Pro- oder Eukaryonten) und intrazellulärer Lokalisation des Genoms (Kern, Mitochondrien, Chloroplasten). Es handelt sich zusammenfassend um Entfernung von Sequenzen am 5'- und am 3'-Ende der RNA, Capping am 5'-Ende, Polyadenylierung am 3'-Ende, Modifikationen der RNA und die Excision von Intronsequenzen.

Seit den ersten Berichten im Jahre 1977 über den Aufbau etlicher viraler und zellulärer Gene aus diskreten, codierenden Segmenten, die durch nichtcodierende Bereiche unterbrochen werden (Breathnach and Chambon 1981, Abelson 1979), hat sich im Laufe der Jahre ein wesentlicher Unterschied im Aufbau der Gene von eukaryontischen und prokaryontischen Organismen offenbart. Während bei letzteren die Nukleotid-Sequenz des Genes in der Regel colinear zur Aminosäuresequenz des entsprechenden Genproduktes ist, sind zahlreiche Gene bei Eukaryonten mosaikartig aufgebaut: der codierende Bereich ist an mehr oder weniger vielen Stellen durch Sequenzabschnitte unterbrochen, die keine codierende Funktion haben. Bei der Expression solcher "split genes" wird zunächst die komplette DNA-Sequenz des Genes transkribiert; anschließend werden die intervenierenden Sequenzen (IVS) durch einen "Spleißen" genannten Prozess Basenpaar-genau excisiert.

Introns werden in den unterschiedlichsten Genen gefunden: Beispiele von "split genes" finden sich in viralen, nukleären und mitochondrialen Genen, sowie in Genen auf der DNA von Chloro-

plasten (Breathnach and Chambon 1981, Wallace 1982). Es scheint klar zu sein, daß bei Eukaryonten mindestens drei Spleiß-Mechanismen existieren, die sich nach der Art, wie die Spleißpunkte erkannt werden, unterscheiden (Abb. 1a).

Für die **Ersie Reaktionsklasse**, der die Intronexcision aus kerncodierten mRNA-Vorläufern zugeordnet wird, ist die Erkennung von kurzen, konservierten Sequenzabschnitten an den Spleißpunkten (5'AI ..IVS..GI 3') charakteristisch. Zusätzlich ist ein weiterer kurzer Sequenzabschnitt innerhalb der intervenierenden Sequenz für korrektes Spleißen nötig, der in Introns von Kerngenen bei Hefe stark konserviert ist (sog. TACTAAC-Box), in höheren Organismen jedoch durch eine recht allgemeine Konsensus-Sequenz (PyXPyTPuAPy) definiert ist. Dieser Sequenzabschnitt befindet sich nahe dem 3'-Ende des Introns. Der Spleißprozeß scheint in zwei distinkten Schritten abzulaufen (Abb.1b): in einem ersten Schritt wird das Primärtranskript am 5'-seitigen Exon-Intron-Übergang geschnitten und gleichzeitig das freie 5'-Intronende durch eine 2'-5'-Phosphodiesterbrücke mit der vorletzten Base der oben genannten Konsensus-Sequenz (diese ist stets ein A) verknüpft. Das entstehende Zwischenprodukt des Spleißprozesses, die sog. Lariatstruktur, konnte isoliert werden (Keller,1984). Im nächsten Schritt erfolgt dann der Schnitt an der 3'-Spleißstelle und die Verknüpfung der freien Exonenden. Ein relativ umfangreicher Komplex aus RNA und Proteinen (snRNP = small nuclear ribonucleoprotein particles) ist für das Spleißen bei dieser Reaktionsklasse notwendig.

Es kann bis jetzt noch keine Aussage darüber gemacht werden,

welche Funktionen (katalytische, räumliche Orientierung der RNA, Regulation des Spleißprozesses, etc.) von den einzelnen Komponenten übernommen werden. Die Hinweise jedoch auf die absolute Notwendigkeit dieser zusätzlichen Komponenten sind zahlreich.

In vitro-Experimente haben gezeigt (Turner 1985), daß das Auftreten von Endprodukten des Spleißvorganges erst nach einer "lag"-Phase von ca. 30 min zu beobachten ist; während dieser Zeit bildet sich ein 60S RNA-Protein-Komplex aus (Grabowski et al.1985) (in Hefe ein 40S Protein-RNA-Komplex (Brody et al.1985)). Dieser Komplex enthält snRNPs, u.a. U1-RNP, wie durch Präzipitation mit spezifischen Antisera nachgewiesen werden konnte. Die Annahme, daß die U1-RNA am Spleiß-Prozeß beteiligt ist, wird heute aufgrund zahlreicher Indizien, die dafür sprechen, allgemein akzeptiert (Lerner et al.1980, Rogers et al.1980, Yang et al.1981, Padgett et al.1983, Krämer et al.1984).

Eines der Hauptprobleme beim Verständnis des Spleißprozesses ist die Frage, wie die oftmals sehr weit voneinander getrennten Exonenden sich räumlich so nahe kommen, daß sie nach Intronexcision kovalent miteinander verknüpft werden können. Diese Aufgabe mag in den proteincodierenden RNAs des Kernes von den verhältnismäßig umfangreichen Strukturen des Spleißkomplexes übernommen werden, da an die Vorläufer-RNA nur geringe Ansprüche hinsichtlich Primärsequenz und offensichtlich keine an eine bestimmte Sekundär- oder Tertiärstruktur bestehen, wie zahlreiche experimentelle Studien (Deletionsmutationen in Introns, "trans-splicing" in vitro (Konarska et al.1985) vermuten lassen.

Die zweite Klasse von Reaktionen ist dadurch charakterisiert, daß die noch in der Vorläufer-RNA befindliche Intronsequenz eine komplizierte Sekundär- und vermutlich Tertiärstruktur annimmt, und daß diesem Gebilde die Fähigkeit inhärent ist, den dem Intron entsprechenden RNA-Abschnitt autokatalytisch exakt zu excisieren. Die Sequenzen an den Exon-Intron-Übergängen zeigen kaum Konservierung. Innerhalb der Introns finden sich jedoch konservierte Sequenzabschnitte, die den Kristallisationspunkt beim Aufbau der Sekundärstruktur darstellen.

Zusätzliche Komponenten sind auch bei der II. Reaktionsklasse in vivo in jedem Fall erforderlich; davon zeugen im offenen Leserahmen einiger Introns lokalisierte, in trans komplementierbare Mutationen, die das Spleißen verhindern, außerhalb des betreffenden Genes liegende Mutationen, die zu Spleißdefekten führen (z.B. *pet*⁻-Mutationen in Hefe) und extragenische Suppressormutationen, die zu Spleißdefekten führende Intronmutationen wieder rekonstituieren (*sup*⁻-Mutationen, z.B. von Intron 1,3 und 4 des *cob*-Gens in Hefe Mitochondrien).

Abb. 1a) (S.7) Die Erkennung der Spleißpunkte in 3 Klassen von RNA Spleiß-Reaktionen.

Klasse I: das Spleißen von Kern-mRNA-Vorläufern ist durch die Erkennung der konservierten Sequenzen an den Enden der Intronsequenz und die Beteiligung von U1-snRNPs charakterisiert.

Klasse II: (enthält Kern rRNA und mitochondriale mRNA und tRNA Vorläufer) ist durch die Ausbildung einer Intron-Sekundärstruktur charakterisiert, welche das Intron zum "Self-splicing" befähigt.

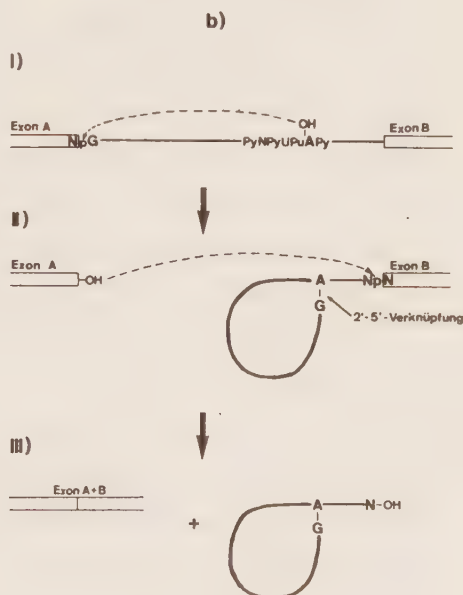
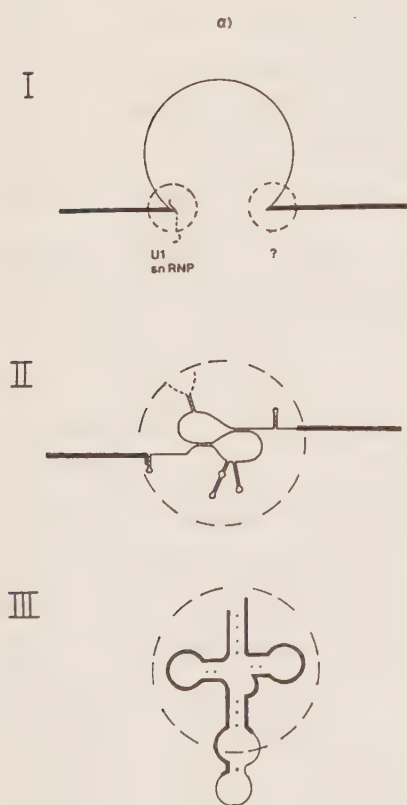
Klasse III: das Spleißen von Kern-Vorläufer-tRNAs; es wird die Sekundär- und Tertiärstruktur des Exonanteils erkannt.

Die Exonanteile sind durch dicke Linien, Intronanteile durch dünne Linien wiedergegeben. Gestrichelte Kreislinien geben die für exakte Intronexcision wichtigen Domänen innerhalb der Vorläufer-RNA an (nach Greer et al. 1984).

Abb.1b) Intermediate und Produkte des Spleiß-Prozesses bei Introns der Klasse I und Klasse II/Gruppe I;
An der Intronexcision sind 2 Transesterifikationsreaktionen beteiligt:

I) Lariatbildung und gleichzeitige Spaltung der kovalenten Bindung am 5'-Ende des Introns erfolgt durch einen nucleophilen Angriff der 2'-OH-Gruppe des vorletzten A der Konsensus-Sequenz nahe dem 3'-Ende (PyNPPyUPuAPy) an der Phosphat Gruppe des ersten G des Introns.

II) Die anschließende Verknüpfung der beiden Exon-Enden entsteht durch einen weiteren nucleophilen Angriff der OH-Gruppe der letzten Base von Exon A am Phosphatrest der ersten Base von B. Offene Balken stellen Exonanteile dar; p = Phosphatgruppe; Py steht für eine Pyrimidin-, Pu für eine Purin- und N für eine beliebige Base.



Hinsichtlich der konservierten Sequenzabschnitte und des Aufbaus der Sekundärstruktur lassen sich zwei Gruppen unterscheiden (Michel et al.1982): Gruppe I beinhaltet die weitaus meisten Introns; vier konservierte Sequenzblöcke bilden die Basis zum Aufbau einer komplexen Sekundärstruktur, die trotz sehr variabler Sequenzen in allen Introns dieser Gruppe eine verbluffende Ähnlichkeit zeigt, was die Zusammenfassung zu einer Gruppe rechtfertigt. Als Folge der Ausbildung der Sekundärstruktur rücken die beiden Intronenden räumlich sehr nahe zueinander; dies ist offensichtlich eine Voraussetzung für korrektes Speißen. Introns dieser Gruppe sind in den unterschiedlichsten Genen in zahlreichen Organismen, meist in den Zellorganellen, verbreitet: sie wurden bisher gefunden in Protein-codierenden Genen in Mitochondrien (*S.cerevisiae*, *S.pombe*, *A.nidulans*, *N.crassa*), in rRNA-Genen in Mitochondrien (*N.crassa*, *A.nidulans*, *S.cerevisiae*) und im Kern (*Tetrahymena*, *Physarum*) und im tRNA^{1*}-Gen in Chloroplasten von *Zea mays* (Davies et al.1984, Lang 1984, Waring and Davies 1984).

Die zweite Gruppe zeigt einen stark konservierten Sequenzabschnitt, der in den letzten 100bp lokalisiert ist; es läßt sich auch bei dieser Gruppe, unabhängig von der insgesamt etwas geringeren Konservierung auf Primärsequenzniveau, eine für alle Introns charakteristische Sekundärstruktur bilden. Introns dieser Gruppe finden sich u.a. in proteincodierenden Genen in den Mitochondrien von *S.cerevisiae*, *S.pombe*, *P.anserina* und *Z.mays*, in den für tRNA^{1*} und tRNA^{1*} codierenden Genen von *Zea mays* Chloroplasten und im psbA-Gen von *Euglena gracilis* Chloroplasten (Michel et al.1983, Schmelzer et al.1983, Osiewacz et al.1984,

Michel and Lang 1985, Keller et al.1985).

Bei in vitro Untersuchungen konnte zunächst an der Vorläufer-rRNA von Tetrahymena demonstriert werden, daß bei geeigneten Inkubationsbedingungen die Excision des Introns aus der Vorläufer-RNA spontan und ohne Anwesenheit irgendwelcher Proteine erfolgen kann (Kruger et al.1982). Im Laufe der folgenden Jahre wurde diese Fähigkeit zum "Self-Splicing" auch bei einigen anderen Introns der Gruppe I (van der Horst 1985, Garriga and Lambowitz 1985), in jüngster Zeit auch von solchen der Gruppe II nachgewiesen (van der Veen et al.1986, C.Schmelzer, pers.Mittlg.).

Die oben angeführten Indizien für die Notwendigkeit von zusätzlichen Komponenten zum Herausschneiden der Introns auch bei der Reaktionsklasse II steht keineswegs im Widerspruch zu der Beobachtung, daß bei einigen Introns dieser Klasse die Fähigkeit zum "Self-splicing" in vitro nachgewiesen werden konnte: "Self-splicing" geschieht relativ ineffizient (Spleißen in vitro des Tetrahymena rRNA Introns ist 60x langsamer als Spleißen in vivo (Kruger et al.1982) und nur unter bestimmten Inkubationsbedingungen. In situ mag "Self-splicing" kaum oder gar nicht möglich sein, da entweder das Milieu nicht geeignet ist oder negativ regulierende Faktoren vorhanden sind. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, daß Introns, die nachgewiesenermaßen zum "Self-splicing" befähigt sind (z.B. 35S rRNA von N.crassa (Garriga et al.1984) in vivo bei Vorhandensein einer bestimmten Kernmutation nicht mehr excisiert werden können. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß manchen Vertretern dieses Introntyps diese Fähigkeit abhanden gekommen ist. Ursachen dafür wären, daß durch Rekombinations- und/oder Insertionsereig-

nisse das Intron so groß geworden ist, daß die nötige Stabilität der Sekundärstruktur ohne Hilfeleistung von Proteinen nicht mehr erreicht werden kann, oder daß durch wechselseitige mutative Anpassung der beiden Reaktionspartner (RNA/Proteinfaktoren) ein abhängiges Verhältnis entstanden ist; es kann gegenwärtig jedenfalls nicht beurteilt werden, ob in vivo Selektion dafür besteht, daß die Vorläufer-RNA diese enzymatische Aktivität behält, oder ob die notwendigen Hilfsproteine den Spleißprozeß bereits so eigenständig führen, daß sich die Beteiligung der RNA am Reaktionsprozeß selbst erübrigt.

Die Spleißreaktionen in Klasse I und II haben einige interessante Gemeinsamkeiten: die Intronexcision erfolgt in beiden Klassen in 2 Schritten, wovon jeder einzelne einen endonukleolytischen Schnitt und eine nachfolgende Ligation beinhaltet. In beiden Fällen bleiben die Phosphatgruppen in den Produkten und die Anzahl der Phosphodiesterbindungen vor und nach der Reaktion erhalten. Beide Prozesse können als eine Serie von Transesterifikationsereignissen zwischen Hydroxylgruppen und Phosphodiester-Bindungen betrachtet werden.

Sowohl in Klasse I als auch in Klasse II tritt die Intron-RNA als Lariat-Zwischen- oder Endprodukt auf; dieses Molekül wird stets durch die Verknüpfung eines G am 5'-Ende (sei dies ein externes, wie bei den "Self-Splicing"-Reaktionen der KlasseII/GruppeI-Introns oder ein bereits vorhandenes, wie in Klasse I und KlasseII/GruppeII) mit einem A nahe dem 3'-Ende des Introns gebildet (Abb.1b).

Die genannten Gemeinsamkeiten lassen vermuten, daß die zur Autokatalyse fähige RNA ("Ribozym") einen Überrest eines sehr ur-

sprünglichen Moleküls darstellt. Die Möglichkeit, daß RNA-Spleißen eine primitive und ursprüngliche Reaktion ist, wirft ein neues Licht auf die Alternative, ob Mosaikgene nur von Eukaryonten entwickelt wurden oder ob Prokaryonten eine solche ursprüngliche Genstruktur aus Gründen der Ökonomie aufgegeben haben. Die kürzliche Identifikation von Introns in zwei tRNA-Genen von Archaeobakterien (Kaine et al. 1983) und im Thymidylat-Synthase-Gen des Bakteriophagen T4 (Chu et al. 1984) scheint letztere Hypothese zu unterstützen.

Bei der dritten Klasse von Reaktionen, dem Spleißen von kerncodierten Vorläufer-tRNAs, ist die Struktur des Exonanteils im Spleiß-Substrat ausschlaggebend (Cech, 1983). Gegen eine sequenzspezifische Erkennung der Intron-Enden spricht die Abwesenheit irgendwelcher konservierter Sequenzen an den Spleißstellen, gegen die Bedeutung interner Intronsequenzen die Tatsache, daß große Deletionen oder Insertionen im Intron keinen Effekt auf das Spleißen zeigen (Johnson et al. 1980; Raymond et al. 1983) und das seltene Auftreten von Intronmutationen (Kurjan et al. 1980). Dagegen zeigen alle bisher untersuchten Vorläufer-tRNAs eine Gemeinsamkeit: stets liegt die IVS eine Base 3' vom Anticodon. Die Intronsequenz bildet somit eine Erweiterung des Anticodon-Loops, und stört damit nicht die hochkonservierte Sekundär- und Tertiärstruktur des Exonanteils, welcher die Konfiguration der reifen tRNA annehmen kann.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Analyse von Introns der Reaktionsklasse II. Ihr Ziel ist die Identifikation von Elementen der Intron-RNA-Sekundärstruktur (die zu Beginn dieser

Arbeit unbekannt waren) und anderen Signalsequenzen. Als Untersuchungsobjekt wurde exemplarisch ein Mosaikgen auf der DNA in Mitochondrien von *S.cerevisiae* ausgewählt.

Mitochondrien besitzen, ebenso wie Chloroplasten, ein eigenes Genom. Sie sind jedoch in ihrer Kodierungskapazität sehr beschränkt. Der Großteil der Proteine, die die Mitochondrien für ihre Funktion benötigen, wird im Kern codiert, im Cytoplasma translatiert und in die Mitochondrien transportiert. Dies gilt für alle Enzyme des Citratzyklus und der Fettsäureoxidation und die meisten Komponenten der oxidativen Phosphorylierung, der Atmungskette und selbst des Transskriptions- und Translationsapparates des Mitochondrien-eigenen Genoms.

Alle bisher untersuchten mitochondrialen Genome codieren für einige Komponenten des mitochondrialen Translationsapparates. Das sind im einzelnen 2 rRNA-Moleküle und 23-25 tRNAs; Hefe-mtDNA codiert zudem für ein Ribosomen-assoziiertes Protein. Weiter codieren Mitochondrien für eine begrenzte Anzahl von Proteinen, die zur Atmungskette auf der mitochondrialen Innenmembran gehören und für die oxidative Phosphorylierung benötigt werden: Cytochrom Oxidase Untereinheiten I, II und III, Cytochrom b und je nach Organismus 2 oder 3 Untereinheiten der ATPase. Die Gene, die auf der mtDNA der Hefe *S.cerevisiae* identifiziert wurden, sind in Abb.2 gezeigt.

Drei Gene auf dem mitochondrialen Genom von *S.cerevisiae* sind mosaikartig aufgebaut: *cob*, *oxi3* und das Gen für die große ribosomale RNA. Sämtliche dort gefundenen Introns werden der oben genannten II. Reaktionsklasse zugeordnet.

In Hefe ist die Fähigkeit zum "Self-Splicing" bisher bei Intron

5ß des oxi3 Genes (van der Veen et al.1986), bei Intron 1 des ccb-Genes (C.Schmelzer, pers.Mittlg.) und beim Intron der w⁺rDNA (van der Horst and Tabak 1985) nachgewiesen worden.

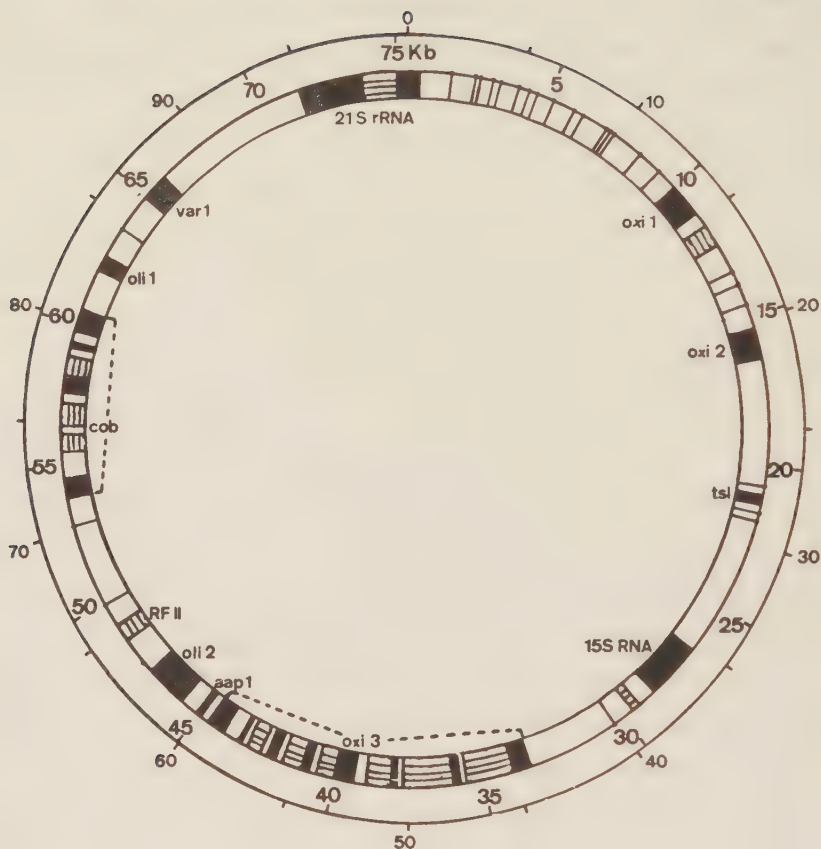


Abb. 2 Das mitochondriale Genom von *Saccharomyces cerevisiae* hat eine Länge von ca. 80 kb. Das circulaire Genom codiert für 7 identifizierte Proteine (cob, oxi1,2,3, oli1,2, aap1), 3 Leserahmen unbekannter Funktion (RFI,II,III), die große (21S) und kleine (15S) ribosomale RNA und 25 tRNA Moleküle. 3 Gene sind mosaikartig aufgebaut. Das Var1-Polypeptid wird als ein Ribosomen-assoziiertes Protein angesehen.

Exonanteile sind durch schwarze Segmente, offene Leserahmen in Introns durch schraffierte Segmente dargestellt. Dünne radiale Linien zeigen tRNA-Gene an (nach Dujon 1983).

Die meisten der Introns sind optional in dem Sinne, daß ihr Auftreten stammbabhängig ist. Zumindest eines jedoch, nämlich das vierte Intron des Cytochrom b-Genes in Hefe ist nur in einem bestimmten genetischen Kontext entbehrlich, da es für das Slicing eines weiteren Introns (aI4) benötigt wird (de la Salle et al.1982). Zahlreiche Introns besitzen, meist in Phase mit dem vorangehenden Exon, einen offenen Leserahmen, der, wie an Intron 2 und 4 von cob experimentell bestätigt, translatiert wird (Lazowska et al.1980, Bechmann et al.1981, Weiss-Brummer et al.1982). Das Translationsprodukt (die sog. Maturase) muß für das korrekte Herausschneiden des betreffenden Introns in intakter Form vorhanden sein. Welche Funktion die Maturase dabei hat, ist bislang unbekannt.

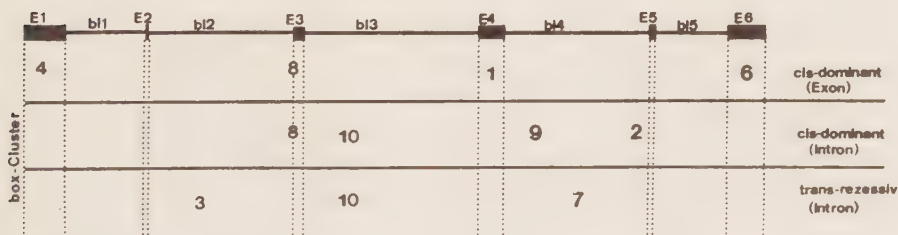


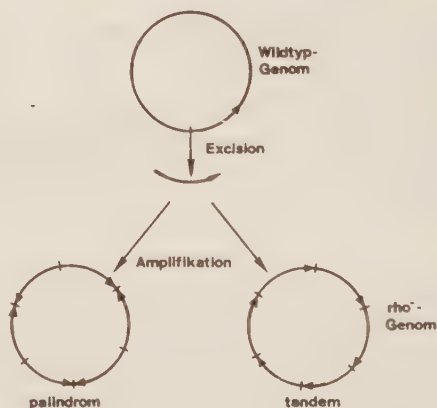
Abb. 3 Die lange Version des cob-Genes, codierend für Cytochrom b (385 Aminosäuren). Die Cluster von Mutationen sind mit "box" und einer Zahl bezeichnet; letztere spiegelt die Reihenfolge der Isolierung wieder. Jedes Cluster überstreicht eine kurze genetische Distanz, die zu einer maximalen Rekombinationsfrequenz von ca. 1% führt. Die Cluster sind voneinander meist durch größere Distanzen, in der Größenordnung von 2-9% Rekombinationsfrequenz, getrennt. 2 der Cluster sind nicht einheitlich: Das box8 Cluster enthält sowohl Exon- als auch Intronmutationen, das box10 Cluster besteht aus cis-dominanten und trans-rezessiven Mutationen.

Saccharomyces cerevisiae ist ein fakultativer Anaerobier. Dies

ermöglicht die Isolierung von Mutanten mit Defekten in mitochondrialer Energiegewinnung. Mitochondriale Mutanten lassen sich grob zwei Klassen zuordnen:

1) ρ^- -Mutanten tauchen spontan und mit großer Häufigkeit auf; sie sind das Ergebnis von Makrodeletionen der mitochondrialen DNA (bis zu 99,9%). Das verbleibende DNA-Fragment wird so oft amplifiziert, bis die ursprüngliche Genomgröße in etwa wieder erreicht ist (Bernardi 1979, Faye et al. 1973) (Abb.4). Die Folge des Verlustes des Großteils des mitochondrialen Genoms ist die Unfähigkeit der Mutanten zur mitochondrialen Proteinsynthese und damit Atmungsdefizienz. ρ^- -Mutanten waren beim Aufbau einer genetischen Karte des mitochondrialen Genoms von unschätzbarem Wert und erweisen sich bei der genetischen Kartierung von mitochondrialen Punktmutationen noch immer als unentbehrlich.

Abb. 4 Schematische Darstellung der ρ^- -Bildung bei Hefe mitochondrialer DNA: ein DNA-Fragment wird excisiert und anschließend so oft amplifiziert, bis das resultierende Molekül die ursprüngliche Genomgröße erreicht hat. DNA-Fragmente können in tandem reiteriert sein oder eine palindrome Struktur einnehmen.



2) Die zweite Klasse, $\text{mit}^-/\text{syn}^-$ -Mutationen sind Punktmutationen, in einigen Fällen auch Deletionen (Tzagoloff et al. 1975, Dujon

1981), die jeweils eines der Produkte der mitochondrialen Gene betreffen. Die Bezeichnung "mit-" bezieht sich auf Mutationen in proteincodierenden Genen, "syn-" auf rRNA und tRNA codierende Gene. Eine große Anzahl von Punktmutationen, die zur Atmungsdefizienz führen, sind in allen bekannten mitochondrialen Genen kartiert worden. In den Genen cob und oxi 3, die beide mosaikartig aufgebaut sind, wurden Punktmutationen sowohl in den Exons als auch in den Introns gefunden.

Die Mutationen, welche die Synthese von Cytochrom b verhindern, wurden in einer Reihe von Clustern kartiert. Die hier interessierende Gruppe von Clustern (box 8(z.T.), 10(z.T.), 2 und 9) besteht aus (wie Exonmutationen) cis-dominanten, jedoch in Introns lokalisierten Mutationen. Mit genetischen Methoden können diese Mutationen nicht von solchen im Protein selbst unterschieden werden. Biochemisch zeigt sich jedoch ein gravierender Unterschied. Während bei den allermeisten Exonmutationen die reife mRNA gebildet wird, ist bei den Intronmutationen das Processing der Vorläufer-mRNA blockiert: dasjenige Intron, in welchem die Mutation liegt und alle nachfolgenden (außer b15) können nicht excisiert werden (polarer Effekt) (Schmelzer et al.1982). Die Mutationen betreffen offenbar, obwohl nicht unmittelbar an den Spleißstellen liegend, die Erkennung irgendwelcher Spleißsignale.

Das Ziel dieser Arbeit war, anhand der Analyse von Intronmutationen ein größeres Verständnis der Spleißprozesse in Hefe-Mitochondrien zu gewinnen. Bei Beginn dieser Arbeit waren bereits Komplementationsstudien mit Intronmutanten durchgeführt worden, die zur Unterscheidung von cis- und trans-acting Mutationen führten (Lamouroux et al.1982, Schmidt 1982). Es war jedoch lediglich

bei trans-rezessiven Mutationen zweier Introns (bI4 und bI2) etwas über die Natur des biochemischen Prozesses bekannt, der in den Mutanten gestört war: wie bereits oben erwähnt, ist bei diesen die Synthese der zum Spleißen nötigen Maturase gestört.

Die Bedeutung der in den cis-acting Mutationen gestörten Sequenzen war weitgehend ungeklärt: Sequenzanalysen einiger cis-acting bI4 (box9) Mutanten zeigten, daß die mutativen Veränderungen ca. 300 bp vom Spleißpunkt in einem nur 10bp kurzen Sequenzabschnitt geclustert sind (Weiss-Brummer et al.1982). Die in dieser Arbeit dargestellte, weitere Analyse von cis-acting Mutationen konzentrierte sich zunächst auf diese bereits charakterisierten bI4-Mutanten: In der Hoffnung, Hinweise auf Interaktionen der in den Mutanten betroffenen box9-Sequenz mit anderen Komponenten zu erhalten, die am Spleißprozess beteiligt sind, wurden Revertanten induziert und nach eventuellen Suppressormutationen außerhalb von box 9 gefahndet. Die Charakterisierung solcher Suppressormutationen lieferte grundlegende experimentelle Daten zu den in anderen Labors durchgeführten, computergestützten Sekundärstrukturanalysen von Klasse II-Introns.

Die gleiche Verfahrensweise wie bei der Analyse der box9-Mutanten wurde bei der Charakterisierung von cis-acting Mutationen in bI2 und bI3 angewandt: Nach Vervollständigung der Wildtyp-Sequenzen der entsprechenden Introns und der Lokalisierung und Sequenzierung der Mutationen wurden Revertanten induziert und charakterisiert, wobei bei den Mutationen in bI3 das Interesse hauptsächlich auf kerncodierte Suppressormutationen gerichtet war.

Bei der Erstellung der bI3-Wildtyp-Sequenz wurden im geschlossenen Leserahmen im 3'-Teil des Introns drei dicht aufeinander

folgende sog. GC-Cluster sequenziert. Dies sind ca. 40bp lange, G+C-reiche Sequenzabschnitte, die eine typische Sekundärstruktur ausbilden. Ihr optionales Auftreten trägt, zusammen mit dem der Intronsequenzen, wesentlich zur Variabilität der mitochondrialen Genome verschiedener Hefe-Stämme bei. Ebenso wie Introns konnte ihnen bislang keine Funktion zugeordnet werden. Die besondere Anordnung der Cluster in bI3 bot die Möglichkeit, bei einer vergleichenden Analyse derselben Region in anderen Hefestämmen, einen Hinweis auf den Verbreitungs- und Integrationsmechanismus solcher Cluster zu finden.

II. Material und Methoden

1. Abkürzungen

b	Basen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
CAP	Chloramphenicol
CHX	Cycloheximid
Ci	Curie
cpm	Zerfälle pro Minute (counts per minute)
DMF	Dimethylformamid
dA(C,G,U)TP	Desoxy-adenosin(Cytosin,guanin,uridin)5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
cytDNA	cytoplasmatische DNA
mtDNA	mitochondriale DNA
E	Exon
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
mtGenom	mitochondriales Genom
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
IVS	Intervenierende Sequenz (intervening sequence)
kb	Kilobasen
kd	Kilodalton
MG	Molekulargewicht
MMS	Methylmethansulfonat
o.D.	optische Dichte
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonucleinsäure
cytRNA	cytoplasmatische RNA
mtRNA	mitochondriale RNA
mRNA	Boten RNA (messenger RNA)
rRNA	ribosomale RNA
tRNA	Transfer-RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute (runs per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
TE	Tris-EDTA
TEB	Tris-EDTA-Borat
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UE	Untereinheit
WM -Röhrchen	Wassermann-Röhrchen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β D-Galaktosid

2. Feinchemikalien

Alle Chemikalien waren von dem höchsten verfügbaren Reinheitsgrad. Sie wurden, falls nicht anders angegeben, von der Fa. Merck, Darmstadt bezogen.

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Difco, Detroit Michigan USA
Agarose	Seakem, Maine USA
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Bisbenzimid,H33258	Riedel de Haen, Hannover
BSA	Behring, Marburg
Caesiumchlorid	Baker, Deventer, Holland
CAP	Bayer, Leverkusen
DMS	Fluka, Buchs, Schweiz
DNA(Kalbsthymus)	Boehringer, Mannheim
EDTA	Sigma, St. Louis
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formamid	Fluka, Buchs, Schweiz
Hefeextrakt	Difco, Detroit
HybridisierungsprimerM13	Boehringer, Mannheim
IPTG	Boehringer, Mannheim
Polyethylenglykol	Serva, Heidelberg
Primer f. Sequenzierung	Boehringer, Mannheim
SDS	BHD LTD., Poole, England
TEMED	Serva, Heidelberg
Tris	Sigma, St. Louis
X-Gal	Boehringer, Mannheim
Zymolase 5000	Kirin Brewery Co. Ltd., Japan

3. Enzyme

Restriktionsenzyme	Bethesda, Rockville Maryland USA Boehringer, Mannheim Biolabs, Beverly USA E. Merck
Proteinase K	
DNA-Polymerase (Klenow-Fragment)	Boehringer, Mannheim und New England Nuclear, Dreieich, BRD Biolabs, Beverly USA
Exonuclease III	Boehringer, Mannheim und New England Nuclear, Dreieich, BRD
DNA-Ligase	
DNA-Poymerase Kornberg	Boehringer, Mannheim
Polynukleotidkinase	Boehringer, Mannheim
S1-Nuklease	Boehringer, Mannheim
Phosphatase, alkalische	Boehringer, Mannheim

4. Radiochemikalien

^{32}P dNTP, ^{35}S dNTP	Amersham-Buchler, Braunschweig New England Nuclear, Dreieich, BRD
--	--

5. Sonstiges

Röntgenfilm	Kodak und Dupont
Röntgen-Verstärkerfolie	CAWO, Schrobenuhausen
Nitrozellulose	Schleicher und Schüll, Dassel
3MM-Papier	Schleicher und Schüll, Dassel

6. Genetische Bezeichnungen und Abkürzungen

Bezeichnungen

- ρ^+mit^+ : Wildtyp; keine mutativen Veränderungen auf der mitochondrialen DNA.
- ρ^+mit^- : Punktmutation (oder kurze Deletion) der mtDNA, die zur Atmungsdefizienz führt.
- ρ^- : Makrodeletion (10% - 99,9% des Genoms) der mtDNA, die zu Atmungsdefizienz und Verlust des mitochondrialen Translationssystems führt. Der verbleibende Genomrest wird reiteriert und weitervererbt.
- ρ^0 : Verlust mitochondrialer DNA
- a/α : Paarungstypen
- opl : Kernmutation; führt zu 1) Atmungsdefizienz
2) Letalität von ρ^- -Mutationen (Kovacova et al. 1968)
- kar : Kernmutation; Defekt der Kernverschmelzung; führt nach Paarung zur Abschnürung von Hapliden beider Paarungstypen (Conde and Fink, 1976; Lancashire et al. 1979).

Abkürzungen

- cs kältesensibel (cold sensitive)
hs hitzesensibel
ts temperatursensibel (= hs oder cs oder hs+cs)
rc atmungskompetent (respiratory competent)
rd atmungsdefekt (respiratory deficient)

7. Stämme

verwendete Stämme von *S. cerevisiae*:

Stamm	Kerngenotyp	mtGenotyp	Referenz
777-3A	α ,ade1,op1	rho ⁺ mit ⁺ '-	(Kovacova et al.1968)
IC8/AA1	a,leu1,kar1	rho ⁺	(Lanceshire et al.1977)
IC11/AA2	α ,his ⁻ ,kar1	rho ⁺	(Lanceshire et al.1977)
KL14-4A	a,his1,trp2	rho ⁻	(Schweyen et al.1978)
RM511-4A	a,ura1,trp1	rho ⁻	(Slonimski et al.1977)

cob⁻-Mutanten mit Präfix G oder M sind abgeleitet vom Stamm 777-3A (Kotylak et al.1976, Schweyen et al.1977, Bechmann et al.1981).

verwendete Stämme von *E. coli*

490	recA ⁻	rekombinationsdefekter Empfängerstamm bei Transformation mit pBR 322
JM 101		Empfängerstamm bei Transformation mit M13-DNA

8. Medien und Puffer

Medien

-YD-Medium: Yeast-Extrakt 100g, Glucose 30g, H₂O dest ad 1 Ltr.
(Glucose wurde nach dem Autoklavieren steril zugegeben).

-YG-Medium: wie YD, statt Glucose jedoch 30 ml Glycerin.

w/o-Medium: Difco Yeast Nitrogen Base 7g, Glucose 30g, H₂O dest
ad 1 Ltr.

YDG-Medium: wie YG-Medium, jedoch zusätzlich 0,1% Glucose.

Für die Herstellung der Platten wurde dem jeweiligen Medium 1.5% Agar zugegeben; bei dem w/o-Medium Difco-Agar, sonst Kobe-Agar.

LB-Medium: Bacto-Trypton 10g

Bacto-Yeast-Extrakt 5g

NaCl 10g

H₂O dest ad 1Ltr; der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt.

Für die Herstellung der Platten wurde dem jeweiligen Medium 1.5% Bacto-Agar, für die Herstellung von Top-Agar 0,7% Bacto-Agar zugegeben.

Antibiotika-Platten

Dem Medium für LB-Platten wurde hinzugefügt für

Tetracyclinplatten: 120ug/ml Tetracyclin

Ampicillinplatten: 15ug/ml Ampicillin

Ampicillin wurde als Stammlösung 25mg/ml in Wasser

Tetracyclin als Stammlösung 12,5mg/ml in einem Ethanol/Wasser-Gemisch (50% V/V) zugegeben.

Minimalmedienplatte zur Aufbewahrung des Empfängerstammes bei M13-Transformation, JM101:

pro Ltr. 15g Agar

100 ml M9-Salze

4 ml 50% Glucose

10 ml Mg₂SO₄, 0,1M

1 ml Thiamin (10mg/ml)

10x M9-Salze:

pro Ltr. 150g Na₂HPO₄ x 12 H₂O

75g NaH₂PO₄ x 12 H₂O

30g KH₂PO₄

5g NaCl

10g NH₄Cl

Puffer

TEB-Puffer x 10 (ph 8,3)

Tris 0,9 M

Borsäure 0,9 M

EDTA 2,5 mM

20 x SSC

Natriumchlorid 3 M

Natriumcitrat 0,3 M

2. Biochemische Methoden

2.1 Zucht von Hefezellen und Isolierung von mtDNA

Für DNA-Präparationen wurden die Hefezellen in YD-Medium bei 30°C unter Schütteln bis zur frühen stationären Phase gezüchtet.

Die Isolierung der mtDNA erfolgte nach der Methode von Lang et al. (1977): Die Zellen wurden in Sorbitolpuffer mit Hilfe von Glasperlen ($\emptyset = 0,4\text{mm}$) bis zu einer Ausbeute von 60–80% aufgeschlossen. Bei einem Teil der Hefestämme wurden die Mitochondrien nach vorausgegangener Protoplastierung der Zellen mit Zymolase gewonnen (Lewin et al. 1978). Nach wiederholtem Waschen und Zentrifugieren wurden die Mitochondrien zuletzt bei 20000 rpm selektiv pelletiert. Anschließend wurden die Mitochondrien mit SDS (Endkonz. ca. 1%) lysiert. Dem Lysat wurde NaCl bis zur Endkonzentration von 1 M zugegeben und nach 2h der ausgefallene Niederschlag (vor allem Proteine) bei 15000 rpm pelletiert.

Zur Entfernung von RNA und nicht-mitochondrialer DNA wurde im CsCl-Dichtegradienten (CsCl-Lösung von $1,5\text{ g/cm}^3$ + 1 ng/ml Bisbenzimid (Müller und Gautier, 1975) für 1–2 Tage bei 40000rpm (20°C) im Vertikalrotor zentrifugiert. Falls die mtDNA zur Klonierung isoliert wurde, wurde zur besseren Abtrennung restlicher Kern-DNA eine zweite Zentrifugation im Ti70-Rotor angeschlossen. Die Bande, die die mitochondriale DNA enthält, wurde mit einer Spritze entnommen, 1:1 mit TE verdünnt und mit 2-fachem Volumen Ethanol bei RT gefällt.

Zur Präparation nur geringer Mengen mtDNA wurde die Methode nach Dujon und Blanc (1980) angewandt: Die Zellen aus einer logarithmisch wachsenden 3ml Kultur wurden nach 20 minütigem Verdau mit Zymolase durch heftiges Schütteln aufgebrochen. Nach selektivem

Abzentrifugieren der großen Zelltrümmer wurden die Mitochondrien mit 1%igem SDS lysiert, die Proteine in 1M NaCl-Lösung ausgefällt und die DNA anschließend durch 2-malige Phenolextraktion vollkommen deproteinisiert. Nach Ethanolfällung konnte die DNA dann in Enzympuffer aufgenommen werden. Die Ausbeute betrug pro 3ml Kultur ca. 1-3ug (teilweise stark mit Kern-DNA verunreinigte) mtDNA.

2.2--Restriktion,--Gelelektrophorese--und--Isolierung--von--DNA--Fragmenten--aus--Agarosegelen

Für Restriktionen wurde die DNA in TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) aufgenommen; für sämtliche Restriktionsenzyme wurde ein Standardpuffer gewählt (Biolabs), bei der allein die NaCl-Konzentration nach den Erfordernissen des jeweiligen Enzyms variiert wurde. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Proben für den Elektrophoreselauf mit 1/3 Volumen Bromphenolblaupuffer (10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH7,4, 0,7% Bromphenolblau, Sucrose-gesättigt) versetzt.

Gelelektrophorese: Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte in horizontalen 0,6-1,5%igen Agarosegelen (Grosch et al. 1980). Die Elektrophorese wurde in TEB-Puffer (Peacock and Dingmann 1967) mit 1 ug/ml EB durchgeführt, so daß der Lauf unter UV-Licht beobachtet werden konnte.

Isolierung von DNA-Restriktionsfragmenten: Die aus dem Gel ausgeschnittenen DNA-Banden wurden in einen Dialyseschlauch gegeben und in TEB-Puffer bei 100-200V elektrophoretisch eluiert. Die DNA wurde anschließend aus dem Schlauch pipettiert und konzentriert: entweder erfolgte eine Ethanolfällung, oder die DNA wurde über

Elutip (Schleicher und Schüll) gereinigt und anschließend gefällt.

2.3 Die Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde durch Messung der Absorption bei 260nm gemessen: $1 \text{ OD/ml} \approx 50 \text{ ug/ml DNA}$. Die Reinheit wurde aus dem Verhältnis der Extinktion bei 260 nm und 280 nm abgeschätzt (reine DNA: 1,8 - 2,0).

2.4 Radioaktive Markierung von DNA

2.4.1 Nicktranslation von DNA

Die Markierung der DNA mit ^{32}P -Triphosphaten erfolgte nach der Methode von Rigby et al.(1977), jedoch ohne Zugabe von DNAase. Die Abtrennung der nicht inkorporierten ^{32}P -Triphosphate aus dem Reaktionsgemisch erfolgte über eine Sepharose-G-50-Säule (4ml).

2.4.2 5'-Endmarkierung mit T4-Polynukleotidkinase

Vor der Markierung wurden die terminalen 5'-Phosphate mit alkalischer Phosphatase (Maniatis et al.1982) abgedaut. Polynukleotidkinase und ^{32}P -ATP wurden dann zur Phosphorylierung der vorstehenden 5'-Hydroxyl-Gruppen benutzt (Maniatis et al. 1982).

2.4.3 3'-Endmarkierung mit DNA-Polymerase

Die zurückstehenden 3'-Enden von doppelsträngiger DNA wurden mit dem Klenow-Fragment der E.coli DNA-Polymerase unter Verwendung von ^{32}P -dNTP aufgefüllt (Maniatis et al.1982).

2.4.4 Markierung von in M13-ligierten Fragmenten

War ein für eine Hybridisierung zu markierendes Fragment in M13

ligiert, so wurde die Markierung nach Hu and Messing (1982) durchgeführt: An die einzelsträngige, circulaire Form der M13-DNA wurde ein Primer, der komplementär zur 3'-Region der "multiple cloning site" ist, hybridisiert. Die DNA-Synthese des minus-Stranges, der durch Verwendung von ^{32}P -dNTP markiert wurde, verlief in die Phagen-DNA. Das in M13 ligierte Fragment blieb einzelsträngig.

Vor der Hybridisierung erfolgte keine Denaturierung der heißen Probe.

2.5_Southern-Analyse_von_mitDNA

Die Southern-Analyse wurde durchgeführt, wie in Southern (1975) angegeben.

2.6_Klonierung_von_mitDNA_in_E.coli

2.6.1_Ligation_der_Restriktionsfragmente_in_pBR_322_(Maniatis_et al., 1982)

1 μg pBR322-DNA wurde mit dem entsprechenden Restriktionsenzym vollständig gespalten. Die zu klonierenden Fragmente wurden mit dem Vektor (Endkonz. 50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in 20 μl 1x Ligasepuffer (66mM Tris pH 7,6, 6,6mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 0,4mM ATP) mit 1-2 U Ligase bei 14°C für 10-20 h inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde direkt für die Transformation in E.coli 490recA⁻ verwendet.

2.6.2_Transformation_von_E.coli_490recA⁻_(Lang, 1980)

100ml Übernachtskultur wurde 1:100 mit frischem LB-Medium verdünnt, bis zu einer $\text{OD}_{540} = 0,3-0,6$ weiterinkubiert, und danach wurden die Zellen abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 50mM CaCl_2

suspendiert, 20 min bei 4°C gehalten und danach erneut abzentrifugiert. Dieses Pellet wurde in 3-4 ml 50mM CaCl₂ suspendiert. Je 0,2 ml der kompetenten Zellen wurden mit dem Ligationsansatz gemischt, 20 min bei 4°C, dann 2 min bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde die Kultur 30 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur auf Ampicillinplatten (100-200 µl pro Platte) ausgestrichen.

Bei Ligation des mtDNA-Fragmentes in das für Tetracyclin codierende Gen erhalten Zellen, die das Plasmid mit Insert aufgenommen haben, einen Tet^r Amp^r Phänotyp, wachsen demnach beim Überstempeln der Kolonien von der Ampicillinplatte auf die Tetracyclinplatte nicht an. Von solchen Tet^r-Kolonien wurden Plasmidpräparationen nach Birnboim et al.(1980) durchgeführt. Der Test auf das ins Plasmid integrierte Insert erfolgte entweder durch eine detaillierte Restriktionsanalyse oder, falls ein entsprechendes DNA-Fragment zur Verfügung stand, durch "dot-blot"-Hybridisierung (Maniatis et al.1982).

2.7.Präparation von Plasmid-DNA aus E.coli

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA aus E.coli wurde die Präparationsmethode nach Lang (1980) angewendet: Eine 2l-Kultur wurde bis OD 0,6 bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 170µg/ml CAP 6-15 Stunden unter Schütteln weiter inkubiert. Die Zellen wurden mit Lysozym angedaut und dann mit einer Tritonlösung (Endkonz.0,5-1%) lysiert. Nach Pelletierung großer Zellpartikel (die bei schonender Lyse nahezu die gesamte Kern-DNA enthalten sollten) wurden im Überstand befindliche Proteine wiederholt mit Phenol und Chloroform extrahiert. Anschließend erfolgte eine

Isopropanol-Fällung der Nukleinsäuren und nach erneutem Auflösen in TE wurde zur Abtrennung von RNA und nicht-mitochondrialer DNA im CsCl-Dichtegradienten zentrifugiert. Zum Anfarben der DNA wurde meist Bisbenzimid verwendet. Da generell AT-reiche mtDNA im Plasmid inseriert war, bandiert die Plasmid-DNA bei einer geringeren Dichte als die noch restlich vorhandene, chromosomale DNA.

2.8_Klonierung_von_mtDNA_in_M13

Die Ligation von Restriktionsfragmenten in M13 erfolgte nach demselben Prinzip wie die Ligation in pBR 322. Zur Transformation (Messing et al. 1983) wurden die Zellen (JM 101) in 50mM CaCl₂ kompetent gemacht. 200ul der kompetenten Zellen (Titer ca. 10⁹ Zellen/ml) wurden mit einem Teil des Ligationsansatzes gemischt (5-40ng DNA/200ug Zellen), 40 min bei 4°C, dann 2 min bei 42°C inkubiert. Danach wurde sofort 3ml Topagar (45°C), 20ul IPTG (20 mg/ml in H₂O) und 20ul 2%iges X-Gal (in DMF) zugegeben und die Mischung auf LB-Platte gegossen. Nach etwa 12 Stunden lassen sich blaue (kein Insert) und weiße (+ Insert) Plaques unterscheiden.

2.2_DNA-Sequenzanalyse

2.2.1_Methode_nach_Maxam-Gilbert

Endmarkierte DNA-Fragmente wurden den chemischen Abbau-Reaktionen, wie in Maxam and Gilbert (1980) beschrieben, unterworfen. Die Reaktionsprodukte wurden in 50 cm langen, 0,3 mm dicken Gelen mit Acrylamidkonzentrationen zwischen 4% und 16% aufgetrennt. Die Gele wurden einem Kodak XR 5 Röntgenfilm exponiert.

2.2.2. Dideoxy-Methode nach Sanger

2.2.2.1. Preparation von template-DNA

Zur Isolierung der einzelsträngigen Phagen-DNA wurde eine Übernachtskultur von JM 101 in LB-Medium 1:100 in 2 ml frischem Medium verdünnt und mit M13 infizierten Zellen (Plaque von Platte) angeimpft. Nach 4-8 h Inkubation bei 37°C unter heftigem Schütteln wurden die Zellen bei 12000g abzentrifugiert und die Phagen im Überstand durch Zugabe von PEG 6000 und NaCl gefällt. Die Phagen lassen sich danach abzentrifugieren und in TE (10:1) suspendieren. Nach anschließender Phenolextraktion und Ethanol-Fällung wird die DNA abzentrifugiert und das Pellet in TE (10:1) aufgenommen: Ausbeute ca. 10ug/2ml Kultur (Messing et al. 1983).

2.2.2.2. Hybridisierung von Primer-DNA an das template

Etwa 1ug der einzelsträngigen Phagen-DNA wurde mit ca. 2.5ng Primer (15b Oligonucleotid, etwa im molaren Verhältnis 1:1) unter geeigneten Pufferbedingungen auf 60-70°C erhitzt und anschließend über einen Zeitraum von mindestens 2h langsam abgekühlt (Messing et al. 1983). Die "Annealingreaktion" wurde in beiderseits zugeschweißten Glaskapillaren durchgeführt.

2.2.2.3. Sequenzierungsreaktionen und Sequenzgellauf

Die Sequenzierungsreaktionen erfolgten analog dem Protokoll von Sanger et al. (1977): Je 2ul des Annealing-Gemisches, eines dNTP/ddNTP-Gemisches und einer Lösung von ^{32}P -dATP (1uCi pro Sequenzreaktion) bzw. von ^{35}S -dATP (3uCi pro Sequenzreaktion) in 10 mM Tris wurden zusammenpipettiert. Nach Zugabe von DNA-Polymerase (Klenow-Fragment, ca. 0,5 U pro Sequenzreaktion) wurde für 15 min

bei 30°C inkubiert, nach anschließender Zugabe eines Überschusses von allen 4 dNTPs (Chase) wurde für weitere 15 min inkubiert. Durch Zugabe von in Formamid gelöstem Farbstoff wurde die Reaktion gestoppt. Nach kurzem Denaturieren (ca. 2min bei 100°C) konnten die Proben auf das Gel geladen werden.

Die DNA-Fragmente wurden in 50 cm langen, 0,3 mm dicken, harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen aufgetrennt; die Glasplatten wurden so präpariert, daß das Gel auf einer Platte kovalent gebunden wurde und nach dem Lauf getrocknet werden konnte (Ansorge et al. 1980). Für Fragmente, die GC-Cluster enthielten, wurde das Gel mit Hilfe einer speziellen Platte und eines Wasserbades auf ca. 65°C erhitzt (Ansorge et al. 1980).

2.10--Verkürzung_von_in_M13_klonierten_Fragmenten_mit Exonuclease_III

Nach Klonierung großer Fragmente in M13 ist es notwendig, für die Sequenzanalyse geeignete Subfragmente in M13 zu inserieren. Dies kann entweder durch Schneiden des isolierten Fragmentes mit geeigneten Restriktionsenzymen und anschließende Klonierung dieser Subfragmente oder, falls keine geeigneten Restriktionsschnittstellen im Fragment enthalten sind, durch sukzessive, unspezifische Verkürzung des noch im Phagen inserierten Fragmentes geschehen (Henikoff, 1984): Dazu wurde die replikative Form des Phagen mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten, deren Schnittstellen beide in der Polylinker-Region zwischen Insert-DNA und der Sequenzierungs-Primer-Site lokalisiert sind. Eines der Enzyme hinterläßt ein überstehendes 3'-Ende und schützt den Vektor vor dem Exonuclease III-Angriff. Bei Inkubation mit Exonuclease III wird

nur die DNA des Inserts von der zugänglichen Schnittstelle her exonukleolytisch abgebaut. Durch Entnahme von Proben aus dem Inkubationsansatz in regelmäßigen Zeitintervallen ist es möglich, das Insert von einer Richtung her sukzessive zu verkürzen. Anschließend erfolgte Behandlung mit S1-Nuklease, Klenow-DNA-Polymerase und T4-DNA-Ligase. Mit den fertigen Proben wurden dann kompetente Zellen transformiert. Diese Methode ermöglicht die Gewinnung von M13-DNA, in der eine Schar von unterschiedlich langen Fragmenten mit identischem 5'-Ende inseriert ist.

10. Genetische Methoden

10.1 Induktion und Isolierung von Recombinanten

10.1.1 $MnCl_2$ -Behandlung

Zu Proben (Titer: ca. 10^6 Zellen/ml) der entsprechenden mit⁻-Mutanten wurde Manganchlorid in so bemessener Menge zugegeben, daß Endkonzentrationen zwischen 0,5 mg/ml und 1 mg/ml entstanden. Die Kulturen wurden in Mikrotiterplatte verteilt und nach einer Bebrütungsdauer von 3 Tagen auf YG-Platten (ca. 10^7 Zellen/Platte) transferiert (Putrament et al. 1973).

10.1.2 MMS-Behandlung

Bis zum Titer von ca. 1×10^8 Zellen/ml hochgewachsene Kulturen wurden in 0,1 M PO_4 -Puffer suspendiert. Dazu wurde von einer 10%igen MMS-Lösung soviel zugegeben, daß eine Endkonzentration von 0,5% erreicht wurde. Dieses Gemisch wurde 1/2h bei 30°C inkubiert, danach gewaschen und anschließend unverdünnt auf Glycerinmedium plattiert.

10.2_EB-Behandlung_der_Revertanten

Zellen mit einem Titer von 10^4 /ml wurden in YD-Vollmedium mit einer EB-Konzentration von 0,5mg/ml in der Mikrotiterplatte bei 30°C bis zur frühen stationären Phase hochgezüchtet, anschließend in eine neue Mikrotiterplatte mit frischem EB-haltigem Medium überstempelt und erneut hochgezüchtet. Dieser Vorgang wurde insgesamt 3-4x wiederholt.

Alternativ wurden die Zellen 3-4x nacheinander auf EB-haltige (40ug EB/ml) Vollmedienplatten abgestempelt (Groudinsky et al. 1980).

10.3_Rekombinationskreuzung

Die miteinander zu kreuzenden Zellen wurden auf YD-Platte zusammengetropft. Nach 1-2 Tagen Bebrütung (30°C) wurde der hochgewachsene Rasen auf w/o-Platte überstempelt. Vom dort entstandenen dichten Zellrasen wurde wenig Material abgenommen und so in sterilem Wasser verdünnt, daß bei Ausstreichen von 0,1 ml auf w/o ca. 100 Kolonien auf der Platte entstanden. Wenn diese nach 2-3 Tagen hochgewachsen waren, konnte das Koloniemuster mit einem Samtstempel auf eine Glycerinmedium(YG)-Platte übertragen werden. Nach Bebrütung dieser YG-Platte konnte durch Vergleich von w/o- und YG-Platte festgestellt werden, ob atmungsdefekte Rekombinantten entstanden sind oder nicht.

10.4_Umkreuzung_mit_der_Kernfusionsmutante_IC8/AB1

Cytoduktion unter Benutzung des kar1-1 Stammes IC11 wurde wie in Lancashire and Mattoon (1979) beschrieben, durchgeführt.

10.5_ ~~rho~~⁻-Deletionskartierung

Zur groben Lagebestimmung der Mutationsorte von mit⁻-Mutanten wurde die Methode der rho⁻-Deletionskartierung herangezogen. Dazu wurden die cob-Mutanten mit ausgewählten rho⁻-Stämmen, die nur Teile der ~~cob~~-Region zurückbehalten haben, auf w/o-Platte gekreuzt und nach 2 Tagen Bebrütung auf Glycerinmedium überstempelt. Bei Wachstum der diploiden Nachkommen auf der YG-Platte, d.h. bei Auftreten von Wildtyprekombinanten kann geschlossen werden, daß der Mutationsort innerhalb dem, von dem entsprechenden rho⁻-Klon zurückbehaltenen Genom-Abschnitt, liegt.

10.6_ Tetradenanalyse

Diploide Zellen wurden bis zur stationären Phase vorgezchtet, in wenig Wasser suspendiert und auf Acetatagar ausgetropft. Nach 3-4 Tagen trat in der Regel Sporulation ein.

Zur Analyse der Tetraden wurden diese in 1-2 ml Wasser suspendiert und 15 min mit 40ul Glusulase bei 36° inkubiert. Von dieser Suspension wurde ein Tropfen auf eine Vollmediumplatte gegeben und ausgestrichen. Die vier Sporen eines Askus konnten mit Hilfe eines Mikromanipulators (Leitz) getrennt und auf der Agarplatte verteilt werden.

10.7_ Random-spore-Analyse

Random-spore-Analyse wurde wie in Lang und Kaudewitz (1982) angegeben, durchgeführt.

ERGEBNISSE

Aus einer umfangreichen Kollektion von mit^- -Mutanten (alle im Stamm 777-3A), die sowohl Exonmutanten, als auch cis- und trans-acting Intronmutanten von cqb enthielt, wurden eine Reihe von 16 Intronmutanten, die beim Komplementationstest durch Exonmutanten nicht komplementiert wurden (also cis-dominant waren), ausgewählt und einer näheren Analyse unterzogen. Dies waren Mutanten in 3 Introns des cqb -Genes, die alle der Gruppe I (Michel et al.1982) angehören. Abb.5 gibt ihre Lage im cqb -Gen an.

Die Auswahl dieser Mutanten stützte sich auf Komplementationsstudien von Lamouroux et al.(1980) und C.Schmidt (Diplomarbeit). Die Nukleotidsequenzbestimmung des cqb Genes im Wildtyp, die von Nobrega and Tzagoloff (1980) durchgeführt wurde, umfaßt alle cqb Exons, sowie Introns 4 und 5. Sequenzen des Intron 3 und des 3'Endes von Intron 2 wurden daher in Abschnitt 2.1 und 3.1 bestimmt. Änderungen der Nukleotidsequenzen einiger der hier ausgewählten Mutanten (G2590, P366, G5046 und Mutanten mit Defekt in box9) wurden zu Beginn der vorliegenden Arbeit durch Publikationen von Anziano et al.(1982), Gargouri et al.(1984), Jacq et al.(1982) und Weiss-Brummer et al.(1982) bekannt.

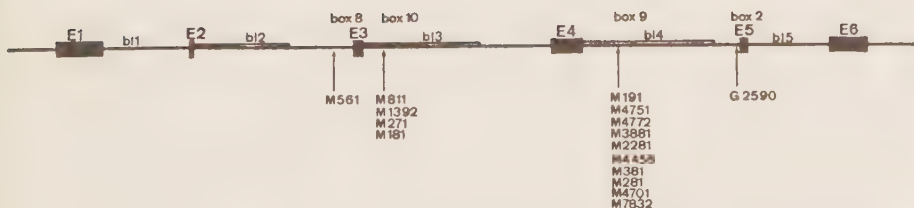


Abb.5 Lokalisierung der untersuchten cis-acting Mutationen auf dem cqb -Genom des Stammes 777-3A. Der Pfeil gibt die ungefähren Positionen der Mutationen an, wie sie aus der rho^- Deletionskartierung (Bechmann et al.1981) und aus Rekombinationskartierungen (Schweyen, unveröffentlicht) gewonnen wurden. Schwarze, breite Balken stellen Exons, offene schmale Balken stellen offene Lese-rahmen in Introns dar.

1. Intron 4

1.1 Cis-acting Mutationen in Intron 4

Im Intron 4 des *gpb* Genes wurden cis-acting Mutanten an 2 unterschiedlichen Stellen gefunden: 10 bislang sequenzierte Mutationen (Weiss-Brummer et al.1982) bilden das sog. box9 Cluster (Slonimski et al.1978) ca. 330-340 Basenpaare 3' vom B4-I4 Übergang. Acht dieser Mutationen betreffen ein oder zwei der drei Basenpaare an Position 1098-1100 (nach der Nomenklatur von Nobrega und Tzagoloff (1980)).

Alle Mutanten sind bei der Excision von bI4 aus *gpb* Vorläufer-mRNA blockiert und können nicht von Exon-Mutanten in trans komplementiert werden (Lamoureux 1980, Schmelzer et al.1981, Weiss-Brummer et al.1982). Die Analyse dieser Mutationen wird kompliziert durch die Tatsache, daß die box9 Sequenz bifunktionell ist insofern, als sie einerseits ein Spleißsignal darstellt, sie sich andererseits im offenen Leserahmen befindet, dessen Expression eine Voraussetzung für die Bildung des Intron 4 trans-acting Produktes darstellt. Dementsprechend können etliche Mutationen in box9 beide Funktionen stören (Weiss-Brummer et al.1982).

Eine einzige weitere cis-acting Mutation wurde in Intron 4 außerhalb von box9 gefunden: diese ist im 3'-Teil des Introns lokalisiert, ca. 230bp jenseits des offenen Leserahmens und etwa 25bp von dem I4-B5 Übergang entfernt. Diese Mutante bildet zusammen mit W300 (de la Salle et al.1982), einer Mehrfachmutante, die die bp-Änderung von G2590 beinhaltet, das sog. box2-Cluster (Abb.5). In G2590 ist, wie in den Mutanten in box9, die Excision von bI4 aus der *gpb* Vorläufer-mRNA gestört. Mutanten des box9- und box2-Clusters waren Ausgangspunkt der folgenden Untersuchungen. Es

galt die Frage zu beantworten, welcher Art die Spleißsignale sind, die durch die Mutationen zerstört werden. Die Sequenzanalyse der mutierten Bereiche hat zur Beantwortung dieser Frage wenig Beitrag geleistet, stellte jedoch eine geeignete Basis für weitere Arbeiten dar.

Die Mutationen, größtenteils Änderungen eines einzigen Basenpaares, verändern die Intron-RNA in einer solchen Weise, daß es nicht mehr möglich ist, die Intron Sequenz aus der Vorläufer-RNA zu excisieren. Es befinden sich also offenbar Strukturen oder Signale auf der RNA, die selbst oder in Wechselwirkung mit anderen Sequenzen erkannt werden; diese Erkennung ist Voraussetzung für die Intronexcision.

Die zu erkennenden Signale scheinen relativ empfindlicher Natur zu sein, da einfache Basenpaar-Austausche genügen, den Excisionsprozess zu blockieren. Diese nur geringfügigen Veränderungen in den box9-Mutanten lassen es als möglich erscheinen, daß kompensatorische Änderungen in Komponenten, die mit den Spleiß-Signalen auf der RNA interagieren, zur Rekonstitution der Spleißaktivität führen.

Solche Rekonstitution der Spleißaktivität in den Mutantenzellen wird zu Atmungskompetenz führen. Die Analyse von Revertanten bietet somit die einzigartige Chance, bislang unbekannte Wechselwirkungen im Spleißprozess zu entdecken.

1.2. Revertanten von box9-Mutanten

Atmungskompetente Revertanten von box9-Mutanten wurden auf nicht-fermentierbarem Substrat selektiert. Spontane Reversion wurde mit einer Rate von ca 10^{-6} beobachtet, außer bei der Mutante M191,

die eine deutlich niedrigere Reversionsrate (10^{-8}) aufwies.

Von 20 dieser Revertanten wurde die Nukleotidsequenz im box9 Bereich analysiert. Die Ergebnisse (gezeigt in Tabelle 1) lassen erkennen, daß 3 Typen von Revertanten existieren:

- solche, in denen die Wildtypsequenz (box9*) wieder hergestellt ist (Typ I); dieses wurde beobachtet in M381/R46, M4751/R46, M2281/R1 und M4772/R7.
- solche, in denen neue box9 Sequenzen durch Zweitmutation an oder direkt benachbart der primären box9-Mutation entstanden sind (Typ II); derartige neue box9-Sequenzen wurden in allen Revertanten von M191 und von M4458 gefunden.
- solche mit einer Suppressormutation außerhalb der box9-Sequenz (Typ III) - M4751/R2 und M4772/R1 besitzen derartige "second site" Suppressoren.

Nukleotidsequenz des box9-Clusters in bI4 bei Wildtyp, Mutanten und Revertanten

Position	1090	1100	Rev. typ	Anzahl d.Rev.
WT 777-3A	GAGACTAC	A C G CACACTAAAAAATAAA		
cob-M381	GAGACTAC	A C T CACACTAAAAAATAAA		
Rev.M381/R46	GAGACTAC	A C G CACACTAAAAAATAAA	1	1
cob-M2281	GAGACTAC	A C A CACACTAAAAAATAAA		
Rev.M2281/R1	GAGACTAC	A C G CACACTAAAAAATAAA	1	1
cob-M4751	GAGACTAC	A C A CACACTAAAAAATAAA		
Rev.M4751/R46	GAGACTAC	A C G CACACTAAAAAATAAA	1	1
Rev.M4751/R2	GAGACTAC	A C A CACACTAAAAAATAAA	3	1
cob-M4772	GAGACTAC	A C A CACACTAAAAAATAAA		
Rev.M4772/R7	GAGACTAC	A C G CACACTAAAAAATAAA	1	1
Rev.M4772/R1	GAGACTAC	A C A CACACTAAAAAATAAA	3	1
cob-M4458	GAGACTAC	A T T CACACTAAAAAATAAA		
Rev.M4458/R9	GAGACTAC	A T G CACACTAAAAAATAAA	2	5
cob-M191	GAGACTAC	- - G CACACTAAAAAATAAA		
Rev.M191/R5	GAGACTAC	G C G CACACTAAAAAATAAA	2	7
Rev.M191/R1	GAGACTAC	TAC G CACACTAAAAAATAAA	2	2

Tabelle I

Die angegebenen Positionszahlen entsprechen der Nomenklatur von Nobrega und Tzagoloff (1980). Zur Beschreibung der Revertantentypen siehe Text. Die durch Mutationen und Reversionen betroffenen Basen sind eingerahmt.

Die Isolierung und Charakterisierung der Mutanten wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Weiss-Brummer durchgeführt.

In box9 scheint das G an Position 1100 eine wichtige Bedeutung zu haben: von 9 Mutationen in box9, die bislang sequenziert wurden, betreffen 7 dieses G (durch A oder T substituiert), und alle untersuchten Revertanten rekonstituieren dieses G, außer natürlich die Revertanten mit "second site" Suppressoren (M4751/R2 und M4772/R1). Zumindest etliche Basenpaaraustausche werden in der box9-Sequenz toleriert: das C an Position 1099 kann durch ein T ersetzt werden (M4458/R9) und das A an der vorangehenden Position, 1098, kann durch ein G substituiert werden (M191/R5). In beiden Fällen ist das Wachstum der Revertanten auf nicht fermentierbarem Substrat von Wildtypwachstum nicht zu unterscheiden. Ebenfalls toleriert wird die Insertion eines T vor diesen beiden Basen (AC an Position 1098-1099): dies wurde in der Revertante M191/R1 gefunden. Diese unterscheidet sich vom Wildtyp durch ihr temperaturabhängiges Wachstum auf nicht fermentierbarem Substrat: bei 23°C ist das Wachstum drastisch reduziert, während es bei 30°C und 36° ähnlich dem des Wildtyps ist. Diese Temperaturabhängigkeit ist auch im Muster der mitochondrialen Translationsprodukte zu beobachten. In Zellen, die bei 30°C und 36°C gewachsen sind, ist Apocytochrom b in Mengen ähnlich wie beim Wildtyp vorhanden, während es in Zellen, die bei 23°C gewachsen sind, nicht festgestellt werden kann (Weiss-Brummer et al.1983).

Bei zwei Revertanten, M4751/R2 und M4772/R1 blieb die box9-Mutation erhalten (C → A an Position 1100). Der Phänotyp der Revertante muß daher auf eine "second site"-Suppressormutation im Kerngenom oder auf dem mitochondrialen Genom zurückzuführen sein. In einer Reihe von Kreuzungen, die dem Schema von Dujardin et al.(1980) folgten, konnte gezeigt werden, daß die Fähigkeit zur

Suppression in den Revertanten M4751/R2 und M4772/R1 verloren geht, wenn die mitochondriale DNA nach Ethidiumbromidbehandlung komplett deletiert wurde. Im Gegensatz dazu waren ρ^0 -Zellen, die den cob -Bereich zurückbehielten, zur Suppression fähig. Das läßt den Schluß zu, daß die Suppressormutation auf dem cob -Gen lokalisiert ist. Um den relativen Abstand der Suppressormutation von der cob^- -Mutation in $box9$ zu bestimmen, wurden Standardkreuzungen der Revertante mit dem Wildtyp durchgeführt:

$$box9^- sup^- \times box9^+ sup^+.$$

Rekombinanten aus dieser Kreuzung sind:

$$box9^- sup^+ \text{ und } box9^+ sup^-$$

Da die $box9$ -Mutationen M4751 und M4772 temperaturabhängiges Wachstum auf nicht fermentierbarem Substrat verursachen (Bechmann et al.1981) sollte erstere Rekombinante diesen Phänotyp zeigen und daher von spontan entstandenen ρ^0 oder anderen atmungsdefekten Zellen zu unterscheiden sein. Letztere Rekombinante ($box9^+ sup^-$) mag ebenfalls einen konditionellen Phänotyp besitzen. Die Häufigkeit der Nachkommen mit dem konditionellen Phänotyp der Mutanten M4751 und M4772 betrug ca. 1,5%. Daraus ist zu folgern, daß $box9^-$ und sup^- eng benachbart sind (unabhängig davon, ob nur einer oder beide der rekombinanten Typen zu dieser Häufigkeit beitragen). Aus paarweisen Kreuzungen $\rho^+cob^- \times \rho^+cob^-$ mit bekannten mutativen Änderungen (P.P.Slonimski, Z.Kotylak, P.Perlman und R.J.Schweyen, unveröffentlichte Ergebnisse; Weiss-Brummer et al.1980, Lazowska et al.1980) läßt sich errechnen, daß 1,5% Rekombinanten einer minimalen Distanz von etwa 50bp und einer maximalen Distanz von 300bp zwischen den beiden Mutationsorten entsprechen.

Um zu prüfen, ob die sup^- Mutation 3' oder 5' von der box9 -Sequenz lokalisiert ist, wurde die Revertante M4751/R2 mit fünf rho^- -Klonen, die verschiedene Teile von bI4 und Sequenzen 5' davon zurückbehalten haben, gekreuzt. Einige dieser rho^- -Klone müssen das sup^- -Allel enthalten (mit oder ohne die box9 -Wildtyp-Sequenz). In Kreuzungen dieser rho^-sup^+ mit der $\text{rho}^+\text{box9}^-\text{sup}^-$ Revertante wird mit geringer Häufigkeit die temperatursensitive Rekombinante $\text{rho}^+\text{box9}^-\text{sup}^+$ erwartet:



Andere rho^- -Klone haben den sup^+ -Locus verloren und damit auch die Fähigkeit, in Kreuzungen diese Rekombinante zu bilden. Die Ergebnisse (Abb.6) zeigen, daß rho^- -Klone, die Sequenzen 5' von box9 enthalten, das sup^+ -Allel nach Kreuzung in die Revertante einführen können, während Klone die Sequenzen 3' von box9 enthalten dazu nicht in der Lage sind. Diese Beobachtung, zusammen mit der Rekombinationshäufigkeit, die in Kreuzungen $\text{rho}^+\text{box9}^-\text{sup}^- \times \text{rho}^+\text{box9}^+\text{sup}^+$ beobachtet wurde, lassen vermuten, daß die sup^- -Mutation 5' von der box9 -Mutation, zwischen der Exon-Mutante M3013 und box9 , lokalisiert ist.

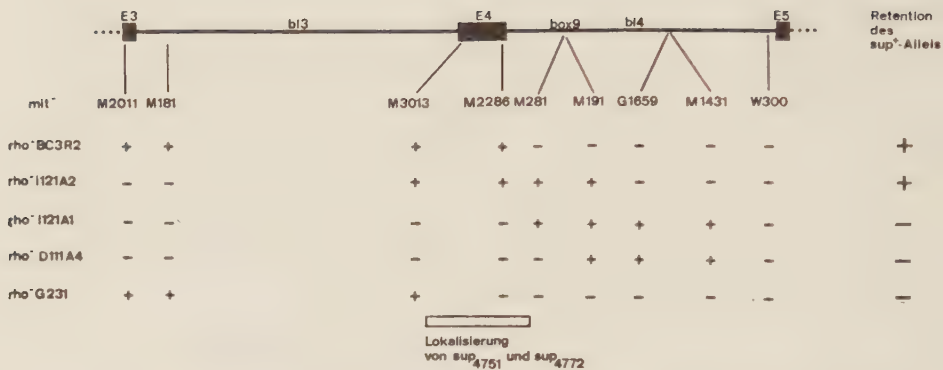


Abb.6 Genetische Kartierung der Suppressormutation von M4751 und M4772 durch rho⁻-Deletionskartierung. Oben: Schematische Darstellung des B3-B5-Teiles des cob-Genes. Die Positionen einiger mit⁻-Mutationen sind angegeben. Unten: Retention(+) oder Verlust(-) des sup⁺ Allels in rho⁻ mtDNA, geschlossen aus dem Ergebnis von rho⁻ x mit⁻ Kreuzungen.

Die Nukleotidsequenz wurde von der EcoRI-Schnittstelle (Exon B4) bis zu box9 in bI4 bestimmt. In beiden Revertanten M4772/R1 und M4751/R2 wurde eine C -> T Transition 47bp vom Exon-Intron-Übergang entfernt gefunden (Abb.7). Die Tatsache, daß beide Revertanten diese bp-Änderung 293bp 5' von der in beiden Fällen identischen box9 Mutation zeigen und dieses in Übereinstimmung mit der genetischen Position der sup⁻-Mutation steht, laßt keinen Zweifel daran, daß dieser Austausch die Suppression der box9-Mutation in M4772/R1 und M4751/R2 verursacht.

Die Ergebnisse deuten auf eine Interaktion zwischen den beiden Bereichen, dem Ort der primären Mutation M4751 und dem der Suppressormutation, hin. Eine genaue Analyse der Sequenz der beiden Abschnitte zeigt, daß diese über eine Strecke von 5 Basen exakt komplementär sind und daher eine intramolekulare Basen-

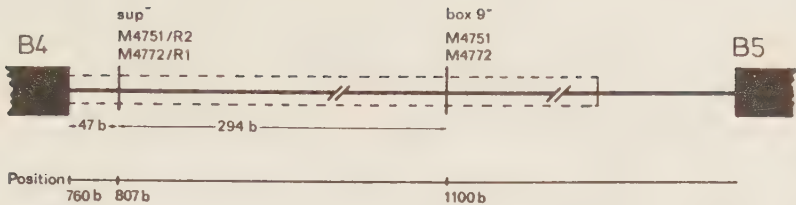


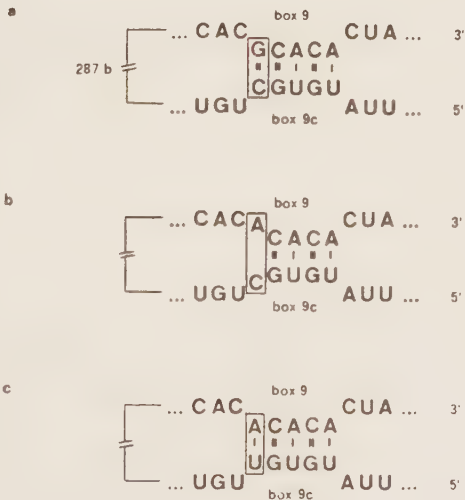
Abb. 7: Lokalisierung der box9 Mutationen M4751 und M4772 und deren Suppressormutationen in bI4. Die Positionsangaben sind nach der Nomenklatur von Nobrega und Tzagoloff (1980); Der Abstand zum Exon B4 ist in Basenpaaren angegeben.

Abb. 8 Intramolekulare Interaktion eines Paares von "inverted repeats" innerhalb bI4. Gezeigt sind die Hybridstrukturen

a) des Wildtyps

(b) der box9 Mutanten M4772 und M4751 und

(c) der Revertanten M4772/R1 und M4751/R2.
(aus Weiss-Brummer et al. 1983)



paarung eingehen können. Diese Paarung wird in der Mutante M4751 (box9) destabilisiert, in der Revertante durch einen kompensatorischen Basenpaaraustausch wiederum perfekt ermöglicht, abgesehen von dem Unterschied, daß eine G-C Paarung im Wildtyp durch eine A-T Paarung in der Revertante ersetzt wurde (siehe Abb.8).

1.3 Das Modell der Intron-Sekundärstruktur

Gleichzeitig mit den dargestellten Ergebnissen wurden von Davies et al.(1982) und Michel et al.(1982) Modelle der Sekundärstruktur von mitochondrialer Intron-RNA aufgestellt, die beide zu im wesentlichen übereinstimmenden Schlußfolgerung gelangten: vergleichende Analyse der Sequenzen von Intron-RNA unterschiedlicher Organismen läßt aufgrund der potentiellen Sekundärstruktur eine Einteilung in zwei deutlich abgrenzbare Gruppen zu: Die weitaus meisten der untersuchten Introns fallen in Gruppe I, zu der auch b14 gehört. Abb.9 zeigt eine Darstellung der Sekundärstruktur von b14, wie sie von Michel et al.(1982) vorgeschlagen wurde: Das box9/box9c-Hybrid (das dem E/E'-Hybrid nach Davies et al.1982 entspricht), welches in der Mutante M4751 betroffen und in der Revertante wiederhergestellt ist, ist in allen Gruppe-I-Introns konserviert und bildet einen zentralen Teil dieser Struktur.

Der box9-Bereich (definiert durch das Auftreten von cis-dominanten Mutationen) erstreckt sich in der Darstellung von Abb.9a über den gepaarten Bereich hinaus in eine einzelstrangige Region. Dieser letztere Bereich besitzt in allen Gruppe I-Introns nahezu identische Nukleotidsequenz. Nahe dem 3'-Ende der Gruppe I Introns befindet sich ein auf Sequenzniveau konservierter Bereich,

a



b

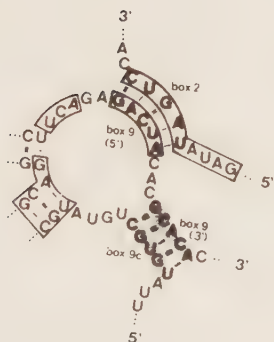


Abb. 9

a) Teil der Sekundärstruktur der bI4 RNA wie vorgeschlagen von Michel et al. (1982); Die Pfeile zeigen die Spleißpunkte an. Die eingerahmten Sequenzabschnitte sind die in allen Gruppe I Introns konservierten Bereiche (Davies and Waring 1982). In Hybridstrukturen involvierte box9- und box2-Sequenzen sind schattiert. Die Zahlen bezeichnen die Position von sequenzierten Mutationen und Reversionen (de la Salle et al. 1982, Weiss-Brummer et al. 1982, Anziano et al. 1982).

1: M4774, M4458, CG→TT.
 2: M2281, M7832, M4751, M4772, G→A; M381 G→T. 3: M191 -AC; M191/R5 -AC→+GC; M191/R1 -AC→+TAC. 4: S3, M281 G→T; V353 G→A. 5: S118 -C. 6: G2457 G→A. 7: G2590, W300-3 G→A. 8: M9S-2/1 C→T (Haldi et al. persönl. Mittlg.).

b) Teil der Sekundärstruktur der bI4-RNA, der die Hybridstrukturen box9-box9c und box9-box2 (schattiert) darstellt.

der über eine Strecke von 5 Basen dem 5' Teil des box9-Bereiches ("R" nach Davies et al.1982) in allen bisher sequenzierten Introns der Gruppe I komplementär ist. Dies legt die Vermutung nahe, daß beide Bereiche evtl. nach Ausbildung der Intron-Sekundärstruktur miteinander in Wechselwirkung stehen (Abb.9b).

Diese Wechselwirkung box9/box2 zu untersuchen, bietet sich eine Mutante im box2-Bereich von b14 an: G2590 zeigt 25bp 5' des 3'-Spleißpunktes eine G → A Transition (de la Salle et al.1982), die die potentielle Paarung mit box9 stören würde. Bei der Suche nach Revertanten von G2590 könnten sich, falls der Paarung box2/box9 tatsächlich Bedeutung zukommt, unter anderen solche finden lassen, die in box9 einen kompensatorischen Austausch besitzen, der unter Beibehaltung der mutierten box2-Sequenz die Ausbildung einer stabilen Paarung und damit Spleißen ermöglicht.

1.4 Isolierung von Revertanten der Mutante G2590

Um Revertanten der spleiß-defekten Mutante G2590, einer box2-Mutante in Intron 4 des *cob*-Genes (de la Salle et al.1982) zu erhalten, wurden die Zellen, wie in Material und Methoden beschrieben, mit $MnCl_2$ behandelt. Circa 150 unabhängig voneinander entstandene Revertanten wurden isoliert und auf das Vorhandensein einer mitochondrialen "second site" Suppressor-Mutation untersucht. Abb.10 stellt schematisch die Reihe der durchgeführten Kreuzungen dar.

In einem ersten Schritt wurden alle Revertanten mit dem Wildtyp-Stamm 777-3A gekreuzt. Wie in Abb. 10/I illustriert, wird ein bestimmter Prozentsatz an atmungsdefekten Rekombinanten sup^+cob^- erwartet, falls die Revertante zwei Mutationen, die Primärmutation box2-G2590 und eine "second site" Suppressor-Mutation sup^- ,

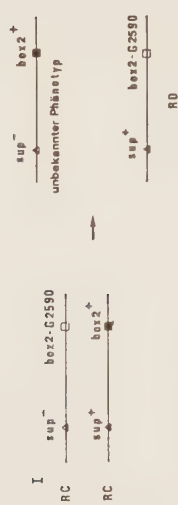
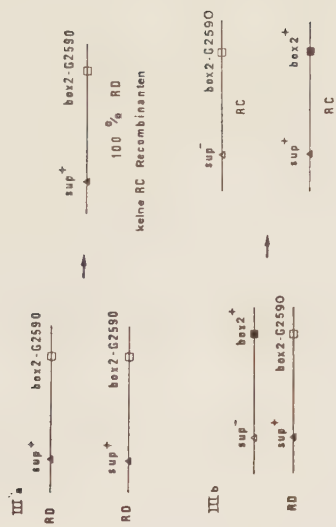


Abb. 10 Durchgeführte Kreuzungen zur Bestimmung des Genotyps der Revertante RA5 von Mutante box2-G2590.

(I) Es wird angenommen, daß Reversion durch eine sup^- -Mutation, die die ursprüngliche box2-Mutation kompensiert, zustande kommt. Nach Kreuzung mit dem Wildtyp ($sup^+ box2^+$) können durch Rekombination Nachkommen entstehen, welche nur die ursprüngliche box2-Mutation (RD Phänotyp) oder nur die sup^- -Mutation (unbekannter Phänotyp) besitzen. Bei Revertante G2590/RA5 resultierten aus dieser Kreuzung 5% RD-Nachkommen.

(II) Die RD-Nachkommen aus Kreuzung I wurden (nach Meiose und Sporulation) mit einer Reihe von ρ^- -Klonen, die unterschiedliche Bereiche von cob zurückbehalten, gekreuzt. Falls sowohl die box2 als auch die sup^- -Mutation RD-Phänotyp verursachen, sollten 2 unterschiedliche ρ^- -Klone gefunden werden, die den RC-Phänotyp wiederherstellen. Jedoch wurde die Atmungsdefizienz bei allen RD aus Kreuzung I durch denselben ρ^- -Klon, der den box2-Bereich enthält, kompensiert ($\rho^- B15$, siehe Abb. 11).

(III) RD-Nachkommen aus Kreuzung I wurden (nach Sporulation) mit der Ausgangsmutante G2590 gekreuzt. Falls die sup^- -Mutation einen RD-Phänotyp verursacht, sollten RC Rekombinanten entstehen(b). Dies wurde nicht beobachtet; alle RD Nachkommen aus Kreuzung I tragen offenbar die box2⁻-G2590 Mutation.

(IV) Um sup^- zu kartieren, wurde die Revertante RA5 ($sup^- box2^+$) mit einer Reihe von ρ^- -Klonen, die verschiedene Teile des cob-Genes zurückbehalten, gekreuzt. Diejenigen ρ^- -Klone, die das sup^+ -Allel enthalten, sollten bei Kreuzung mit RA5 atmungsdefekte Rekombinanten ($sup^+ box2^+$) entstehen lassen. Dies wurde beim ρ^- -Klon B9 und dessen Subklon B9A2 beobachtet.

trägt. Die Rekombinationsfrequenzen zwischen mitochondrialen Markern sind allgemein hoch, so daß eine Distanz von wenigen hundert Basenpaaren zwischen cob^- und sup^- zur Entstehung von >1% Rekombinanten genügen sollte. In den allermeisten Kreuzungen zwischen Revertante und Wildtyp wurden ca. 0,5% atmungsdefekte Nachkommen erhalten; dies spiegelt die Rate der spontanen rho^- -Bildung wider. In vier Kreuzungen jedoch wurden unter den Nachkommen 4-5% atmungsdefekte Kolonien erhalten. Die Revertanten aus diesen Kreuzungen tragen vermutlich einen "second site" Suppressor, der einige hundert Basenpaare von der cob^- -Mutation G2590 entfernt liegt.

Um den Genotyp dieser atmungsdefekten Nachkommen zu bestimmen, wurden von einer dieser Kreuzungen (Wildtyp x Revertante G2590/RA5) insgesamt 50 atmungsdefekte Rekombinanten isoliert und sporuliert, um Haploide für weitere Kreuzungen zu gewinnen. Mit wenigen Ausnahmen bildeten alle atmungsdefekten Rekombinanten eine genügende Anzahl von Sporen. Um nun zu unterscheiden, ob die Rekombinanten $\text{sup}^- \text{cob}^+$ oder $\text{sup}^+ \text{cob}^- \text{G2590}$ sind, wurden die Haploiden mit einer Reihe von rho^- -Mutanten gekreuzt, die unterschiedliche Teile der bI4 mtDNA oder benachbarter Sequenzen (Siehe Abb.10/II a+b und Abb.11) zurückbehalten haben und somit entweder das cob^+ - oder das sup^+ -Allel oder beide Allele tragen. Wiederherstellung der Atmungskompetenz wurde nur mit rho^- -Klonen erreicht, die die box2-Sequenz (cob^+ -G2590, das sind rho^- B14 und B15) zurückbehielten, nicht jedoch mit anderen. Bei Kreuzung dieser Haploiden mit der originalen cob^- -Mutante G2590 wurden keine atmungskompetenten Rekombinanten erhalten (siehe Abb. 10/III a+b zur Erklärung). Diese Resultate zusammengekommen,

zeigen, daß alle Rekombinanten mit atmungsdefektem Phänotyp (die Meiose und Sporulation durchliefen) den Genotyp sup^+cob^- -G2590 besitzen; die andere zu erwartende Rekombinante, sup^-cob^+ konnte nicht entdeckt werden, möglicherweise deshalb, weil dieser Genotyp nicht zur Atmungsdefizienz führt.

1.5_Kartierung_der_Suppressormutation

Um den Ort der Suppressormutation in der Revertante RA5 zu bestimmen, wurde diese mit einer Reihe von rho^- -Stämmen gekreuzt, die verschiedene Teile des cob -Genes zurückbehielten (Abb.11). Es wird erwartet, daß in Kreuzungen mit rho^- -Stämmen, die das sup^+ -Allel zurückbehalten haben, eine signifikante Anzahl von atmungsdefekten sup^+cob^- Nachkommen entsteht (zur Erklärung siehe Abb.10/IV). Der Prozentsatz der atmungsdefekten Zellen war <5%, außer für Diploide, die aus Kreuzungen mit dem rho^- -Klon B9 und dessen Subklon B9A2 hervorgingen, wo ca. 40% bzw. ca. 20% solcher Nachkommen erhalten wurden. Um auszuschließen, daß der beobachtete Prozentsatz durch bevorzugte Transmission der entsprechenden rho^- -Genome (i.e. Suppressivität) entsteht, wurden parallele Kreuzungen der rho^- -Klone mit dem Wildtyp IC11 rho^+ , der isonukleär zu der Revertante RA5 ist, durchgeführt. Aus allen diesen Kreuzungen resultieren ebenfalls <5% atmungsdefekte Nachkommen. Wie in Abb.11 gezeigt ist, haben die rho^- -Klone B9 und B9A2 den 5'-Teil von bI4, das Exon B4 und einen nicht genauer definierten Teil des Intron 3 zurückbehalten (R.J.Schweyen, unveröffentlicht); der 3'-Teil von bI4 und das Exon B5 sind deletiert. Da die Stämme B2 und A2R2 beide einen Teil von Exon B4 und die anschließende Sequenz von Intron3 noch besitzen, offenbar jedoch

nicht das in Frage stehende sup⁺ Allel, muß die Suppressormutation im 5'-Teil von bI4 lokalisiert sein.

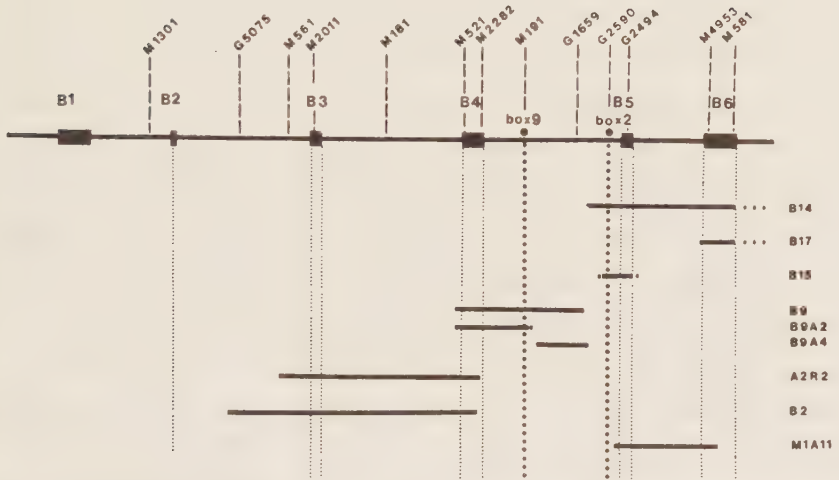


Abb.11 Genetische Karte der langen Form des *cob*-Genes von *Saccharomyces cerevisiae*. Im oberen Teil ist die Lokalisierung einiger mit⁻-Mutationen gezeigt. Im unteren Teil ist die minimale (-) und maximale Ausdehnung (..-) der DNA Sequenz, die von verschiedenen rho⁻-Klonen zurückbehalten ist, dargestellt (Bechmann et al. 1981, R. J. Schweyen, unveröffentlicht, P. P. Slonimski, unveröffentlicht).

1.6 Bestimmung der Nukleotidsequenz von bI4 in der Revertante G2590/B65

Das 2,5 kb Eco RI/Sph I Restriktionsfragment, das von Exon B4 bis Exon B6 reicht (Abb.12), wurde in den Vektor pBR322 kloniert. Einzelne Restriktionsfragmente, die nach Schneiden mit den Enzymen Sau3A und Bgl II (Fragmente a bis d in Abb.12) entstanden,

wurden in die vom Phagen M13 abgeleiteten Vektoren mp8 und mp10 kloniert und anschließend nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al.1977) sequenziert. Abgesehen von der ursprünglichen box2-Mutation, einer G $\rightarrow$ A Transition an Position 1494 (de la Salle et al.1982), wurde beim Vergleichen der bI4 Sequenzen der Revertante mit der entsprechenden Sequenz im isomitochondrialen Wildtyp 777-3A lediglich ein einziger weiterer Unterschied in der Sequenz gefunden. Diese Änderung war eine C $\rightarrow$ T Transition an Position 439, das ist 1055bp 5' von der ursprünglichen box2-Mutation G2590 gelegen. Die C $\rightarrow$ T Transition ist im hoch konservierten 5'-Teil der box9- (oder "R"-) Sequenz, die komplementär zu box2 (oder "S") (Davies et al.1982; Michel et al.1982) ist, lokalisiert. Die Daten aus der genetischen Kartierung und der Sequenzierung der Revertante stimmen überein und lassen die Schlußfolgerung zu, daß diese C $\rightarrow$ T Transition die Suppressormutation in RA5 ist, die den Effekt der box2 Mutation G2590 kompensiert.

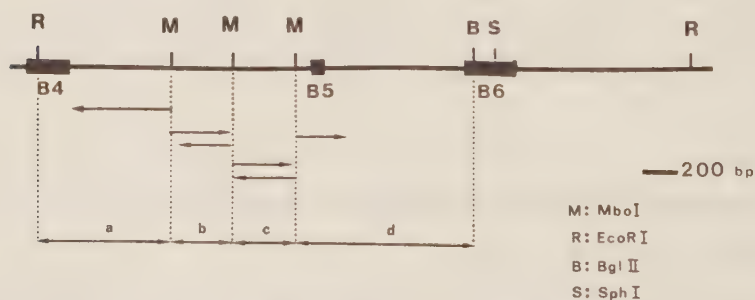


Abb.12 Strategie zur Bestimmung der bI4-Sequenz
Dargestellt ist das EcoRI-Fragment, welches den distalen Teil des cob-Genes beinhaltet. Die oben bezeichneten Restriktionsstellen MboI und BglII wurden zur Gewinnung der Fragmente a-d benutzt. Die Pfeile zeigen die Bereiche an, deren Nukleotidsequenz bestimmt wurde.

Die Ergebnisse zeigen die Interaktion zwischen zwei weit voneinander getrennten Bereichen der Intron RNA im Spleißprozeß an (Siehe Abb.13b).

Ausgehend von der cis-acting cob^- -Mutation G2590 in der box2 (oder "S") Sequenz nahe dem 3'-Ende von bI4 wurde nach Zweitmutationen gesucht, die den Spleißdefekt, der durch die Primärmutation verursacht wird, kompensieren. Es wurde eine Suppressor-mutation gefunden, die sich im 5'-Teil von bI4 befindet, in der sog. box9- (oder "R"-) Sequenz, die mit box2 eine Basenpaarung eingehen und so ein kurzes Hybrid bilden kann (Davies et al.1982, Michel et al.1982). Die Primärmutation ist eine G $\rightarrow$ A Transition (de la Salle et al.1982), der entsprechende Suppressor ist eine C $\rightarrow$ T-Transition, was zur Folge hat, daß das Hybrid box2/box9(5') (i.e. "S"/"R") in der Revertante, verglichen mit dem Wildtyp, einen kompensatorischen Austausch besitzt.

1.7.Modifiziertes Modell der bI4-Sekundärstruktur

Abb.13a und b zeigen die Sekundärstruktur von bI4. Die Darstellung orientiert sich am Modell von Michel und Dujon 1982 (Abb.9), wurde jedoch so abgewandelt, daß die letztgenannten Ergebnisse Berücksichtigung finden. Das hervorstechendste Merkmal ist der zentrale, brückenbildende Teil, der sich aus den Hybriden box9^{3'}/box9c und box9^{3'}/box2 zusammensetzt (in Abb.13c mit E'/E und R/S bezeichnet).

Experimentelle Unterstützung erhielt die Existenz des ersteren, indem, ausgehend von einer box9-Mutation, ein Suppressor im Bereich box9c erhalten wurde (vgl.Abb.8). Für den Nachweis der box9/box2-Paarung wurde analog verfahren: die box2-Mutation

G2590, welche diese Paarung stört, wird durch einen bp-Austausch kompensiert, der wieder exakte Paarung über eine Strecke von 5 Basen ermöglicht (Abb.13a).

Abb. 13

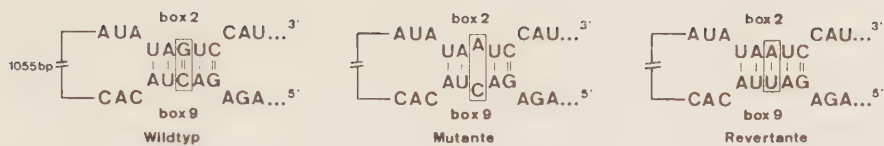
a) Intramolekulare Interaktionen des box2/box9-Paares
Gezeigt sind die Hybridstrukturen des Wildtyps, der Mutante G2590 und der Revertante G2590/RA5.

b) Schematische Darstellung der von der box9-Region gebildeten Hybride. Zusätzlich zu den box9c/box9^{3'}- und box9^{3'}/box2-Hybriden ist das konservierte P/Q-Hybrid gezeigt. Die Pfeile markieren die Exon/Intron-Übergänge.

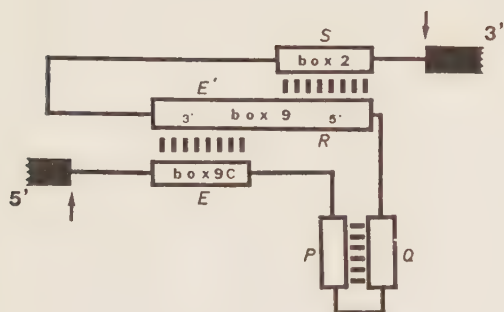
c) Nukleotidsequenz des zentralen Teiles der Sekundärstruktur des Gruppe I-Introns bI4. Exon Sequenzen sind mit dicken Buchstaben gezeichnet, die Pfeile markieren die Spleißpunkte. Die in Gruppe I-Introns konservierten Sequenzabschnitte sind eingerahmt. Durch angezeigt sind die mutativen Änderungen wie von De la Salle et al.(1982), Anziano et al.(1982) und Weiss-Brummer et al.(1982) und in dieser Arbeit bestimmt.

□ markiert vom Wildtyp verschiedene Basenpaare in den Revertanten M4751/R1 und G2590/RA5.

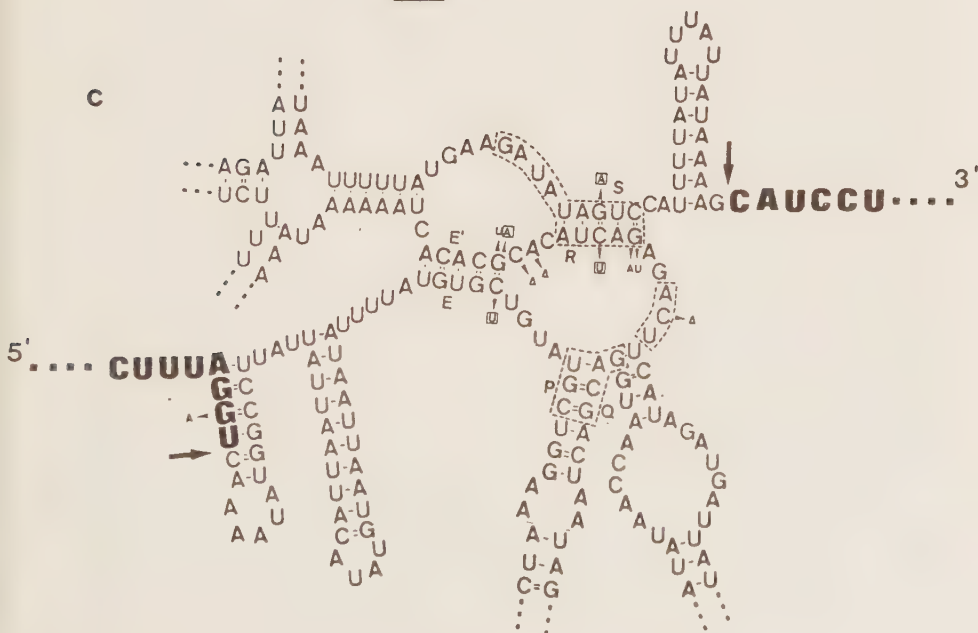
a



b



c



2.-Intron-2

Eine erste schlussige Argumentationskette, die zu dem Ergebnis führt, daß Maturaseproteine in Introns codiert werden, lag bei bI2 vor (Lazowska et al.1980, Kreike et al.1979, Schmelzer et al.1980): Das im Intron codierte Genprodukt muß in intakter Form (als 42kd-Protein) vorhanden sein, damit bI2 aus der Vorläufer-mRNA herausgeschnitten werden kann. Der Weg zur Aufstellung dieses Modells fuhrte über die Analyse von *trans-acting* Mutationen des sog. box3-Clusters, die sich im offenen Leserahmen von bI2 befinden.

Die Analyse von *cis-acting* Mutationen dieses Introns, die analog zu bI4 Aufschluß über wichtige Strukturelemente der Intron-RNA geben konnte, ist bisher aus 2 Gründen nicht weit fortgeschritten: erstens wurden nur zwei solche Mutationen in bI2 gefunden und sequenziert, zweitens gelang es bisher nicht ein Sekundärstrukturmodell für bI2 aufzustellen. Es kann zwar als sicher gelten, daß bI2 wegen des volligen Fehlens irgendwelcher Gemeinsamkeiten nicht als Gruppe II Intron betrachtet werden darf. Die Merkmale, die es ermöglichen würden, das Intron eindeutig der verbleibenden Gruppe I zuzuordnen, sind jedoch schwierig zu bestimmen, nicht zuletzt deshalb, weil die Sequenz der 300 3'-terminalen Basenpaare von Intron 2 noch nicht bekannt war (Lazowska et al.1980).

Es wurde angestrebt, durch Vervollständigung der Sequenz von Intron 2 und Analyse einer zusätzlichen *cis-acting* Mutante in bI2 ein genaueres Bild vom Aufbau der Intron-RNA und Kenntnis von evtl. vorhandenen, für das Spleißen kritischen Strukturkomponenten zu bekommen.

2.1_Sequenzierung_des_5'-Teils_von_Intron_2_im_Stamm_777-3A

Ein Großteil der Intron 2-Sequenz des Stammes 777-3A wurde von Lazowska et al.(1980) publiziert. Der dort sequenzierte Bereich beinhaltet den gesamten 5'-Teil des Introns und reicht 3'seitig ca. 50bp über die einzige MboI-Schnittstelle an Position 949 (Abb.15) in diesem Intron hinaus. Es blieb noch eine bislang nicht sequenzierte Lücke von ca. 250bp. Die Strategie zur Bestimmung der Nukleotidsequenz in diesem Bereich ist in Abb.14 schematisch dargestellt: aus dem HpaII-BamHI-Fragment, das die gesamte erste Hälfte von *gob* umfaßt, wurde ein Subfragment isoliert, dessen Sequenzierung die Nukleotidfolge von der in bI2 gelegenen MboI-Restriktionsstelle bis zur BamHI-Schnittstelle in bI3 lieferte. Die gesamte Nukleotidsequenz von bI2 ist in Abb.15 wiedergegeben. Der neu sequenzierte Abschnitt überlappt 5'seitig mit der bekannten Sequenz um etwa 50bp: hier ist die Übereinstimmung mit der in Lazowska et al.1980 dargestellten Sequenz perfekt. Die letzten 20bp von Intron 2, die in Lazowska et al.1980 noch gezeigt sind, haben eine völlig andere Nukleotidfolge als die hier dargestellte. Offenbar liegt der Fehler in der veröffentlichten Sequenz, wie ein Vergleich der Sequenz im 3'-Teil von bI2 des Stammes FM8 (T.Pillar, pers. Mittlg.) und eine später von Lazowska korrigierte Fassung von bI2 in 777-3A (pers. Mittlg) gezeigt hat. Diese sind mit der in Abb.15 dargestellten Sequenz identisch.

2.2_Kartierung_der_Mutation_M561

Die Mutation M561 liegt am 3'-Ende von Intron 2 im sog. box8-Cluster. Dies wurde aus folgenden Daten geschlossen:

Eine ρ -Retentionskartierung (Abb.16) zeigt, daß M561 5' der

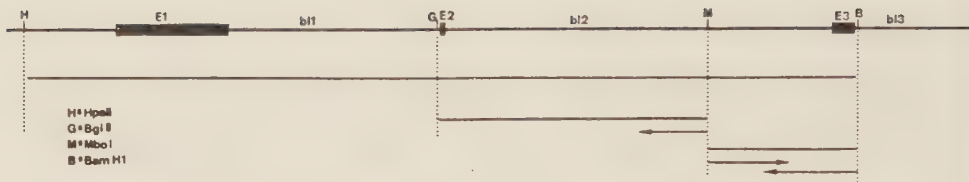


Abb. 14 Strategie der Sequenzierung des 3'-Teils von bI2

Wildtyp: Ein HpaII-BamHI-Fragment von ca. 3000bp wurde in pBR322 kloniert. Das MboI-BamHI-Subfragment, ca. 540bp lang, wurde dann in den Bakteriophagen M13mp8 (Messing 1983) kloniert, selektiert auf Insertion in beiden Orientierungen und anschließend nach der Dideoxymethode (Sanger et al. 1977) sequenziert. Die Pfeile unterhalb des Balkens geben den sequenzierten Bereich an.

Mutante: Aus M561 wurde dasselbe HpaII-BamHI-Fragment wie oben in pBR322 kloniert. Zusätzlich zum oben genannten Subfragment wurde das BglII-MboI Fragment, ca. 1000bp, in M13mp10 kloniert. Der sequenzierte Bereich ist durch den Pfeil angedeutet.

Abb. 15 Nukleotidsequenz von bI2

Die Nukleotidfolge des nicht-transkribierten Stranges ist dargestellt. Die Sequenz bis Position 1947 wurde aus Lazowska et al. (1980) übernommen. Die Aminosäurezuordnung erfolgte gemäß dem genetischen Code der Mitochondrien (Bonitz et al. 1980, Hudspeth et al. 1982). Die Exonsequenzen sind unterstrichen, die V zeigen die Exon-Intron-Übergänge an. Die als E, P, Q, R, E' und S identifizierten Bereiche sind eingerahmt. Die Sequenzen, die für die konservierten Dekapeptide codieren (Hensgens et al. 1983), sind durch unterbrochene Linien markiert.

-9 HIS TRP GLY ^YASN MET ASN ILE ALA SER ASN MET PHE ASN MET MET LYS LEU ILE TYR MET
CAT TGA GGT AAT ATA AAT ATC GCC TCA AAT ATA TTT AAT ATA ATA AAA CTA ATT TAT ATA

+51 MET MET LEU MET LEU LEU ILE TYR ILE PHE TYR THR ILE MET MET ARG GLN MET MET LYS
ATA ATG TTA ATA TTA TTA ATT TAT ATT TTT TAT ACG ATT ATA ATA AGA CAA ATA ATA AAA

+111 THR LYS GLU TYR LEU MET LEU ILE LYS SER MET ASP TYR ILE ASN LYS ASN LYS TYR MET
ACT AAA GAA TAT CTT ATA TTA ATT AAG AGT ATA GAT TAT ATT AAT AAA AAT AAA TAT ATA

+171 ILE ASN LEU MET THR ASN LYS LYS ASP MET ASN ASN ASN ILE GLY PRO LEU ASN MET ASN
ATT AAT TTA ATA ACA AAT AAG AAA GAT ATA AAT AAT AAT ATT GGT CCA TTA AAT ATA AAC

+231 ILE LEU SER ILE ILE TYR GLY SER MET LEU GLY ASP GLY HIS ALA GLU LYS ARG LYS GLY
ATT TTA TCA ATT ATT TAT GGT TCA ATA TTA GGA GAT GGT CAT GCT GAA AAA AGA AAA GGT

+291 GLY LYS GLY THR ARG ILE VAL PHE GLN GLN GLU TYR CYS ASN ILE ASN TYR LEU TYR TYR
GGT AAA GGA ACA AGA ATT GTA TTT CAA CAA GAA TAT TGT AAT ATT AAT TAT TTA TAT TAT

+351 LEU HIS SER LEU LEU ALA ASN LEU GLY TYR CYS ASN THR ASN LEU PRO LEU ILE LYS THR
TTA CAT AGT TTA TTA GCT AAT TTA GGT TAT TGT AAT ACT AAT TTA CCT TTA ATT AAA ACT

+411 ARG LEU GLY LYS LYS GLY LYS ILE ARG GLN TYR LEU LYS PHE ASN THR TRP THR TYR ASP
AGA TTA GGT AAA AAA GGT AAA ATT AGA CAA TAT TTA AAA TTT AAT ACA TGA ACT TAT GAT

+471 SER PHE ASN MET ILE TYR SER GLU TRP TYR ILE LYS ASN MET SER GLY LYS GLY ASN ILE
TCA TTT AAT ATG ATT TAT TCA GAA TGG TAT ATT AAA AAT ATA TCT GGA AAA GGT AAT ATT

+531 LYS VAL ILE PRO LYS SER LEU ASP ASN TYR LEU THR PRO LEU ALA LEU ALA ILE TRP ILE
AAA GTT ATA CCT AAA TCT TTA GAC AAT TAT TTA ACT CCT TTA GCT TTA GCT ATT TGA ATT

+591 MET ASP ASP GLY CYS LYS LEU GLY LYS GLY LEU LYS PHE THR THR ASN CYS PHE SER TYR
ATA GAT GAT GGA TGT AAA TTA GGT AAA GGT TTA AAA TTC ACA ACT AAT TGT TTT AGT TAT

+651 LYS ASP VAL GLN TYR LEU THR TYR LEU LEU HIS ASN LYS TYR ASN ILE LYS SER THR ILE
AAA GAT GTT CAA TAT TTA CTT TAT TTA TTA CAT AAT AAA TAT AAT ATT AAA TCT ACT ATT

+711 THR LYS GLY ASN LYS GLU ASN THR GLN PHE VAL ILE TYR VAL TRP LYS GLU SER MET PRO
CTT AAA GGC AAT AAA GAA AAT ACA CAA TTT GTT ATT TAT GTA TGA AAA GAA TCT ATA CCT

+771 ILE LEU THR LYS ILE VAL SER PRO TYR ILE ILE PRO SER MET LYS TYR LYS LEU GLY ASN
ATT TTA ACT AAA ATT GTA TCT CCT TAT ATT ATT CCT AGT ATA AAA TAT AAA TTA GGT AAT

+831 TYR LEU *** ***
TAT TTA TAA TAAATATATAGTATTATATTAATATATTATTATAATGCGA TATTATTG AAACATGTCAAAAT
E P

+908 TATATTATTAAGTAA AGACAGTGG GTTATATAATTATATGATCC CAACAGAATA CACTAATAA TGGTATTATTATAA
Q R E

+988 AAAAAAATAATAATATTATTTATTTATTCGAAGAAAAATTTATAATATTATTATTATAACACAAGGTTTAATAATCTATA

+1068 TATATATATTATATATATACTACTGTTATTATTCCATTACCTAATTAATATATAAAATGAATTATAATTATTATGA

+1148 TTAATATTTTATAATAATAACCCCATCATCAACATTATATATAACATTATATATAACATTATATATAATTTATAT

+1228 TATGGTATTATTAGGTATA ATATTATTCA TAAGTGAAAAATAGTGATTAATGGAATTATAAAAAAGGGTAGATATTATT
S

+1308 AAATACAGGGTATTATTATTAATAAATCAATAAATATTGAGATTATTATTATTAATAAATAATAAATTTATAAAT

+1388 AATATTATTTCTTGGCA CTA GTT ATT ACT AAT TTA TTC TCA GCA ATT CCA TTT GTA GGT AAC
A

Exon3-Mutation M4216 und 3' der bI2-Mutation M2022 liegt. Damit in Einklang steht, daß bei dieser Mutante im Proteingel ein 42kd-Polypeptid zu finden ist, welches die reife Maturase darstellen soll (Bechmann et al.1980). Die Komplementationsanalyse (C.Schmidt, Diplomarbeit) ergibt, daß die Mutation in *cis* wirkt, also durch Exonmutanten nicht komplementiert werden kann; somit erfolgt der Effekt der Mutation nicht in erster Linie durch Zerstörung der Maturaseaktivität, sondern die Intron-RNA selbst ist betroffen, nämlich so verändert, daß sie nicht mehr als Substrat im Spleißprozess verwendbar ist.

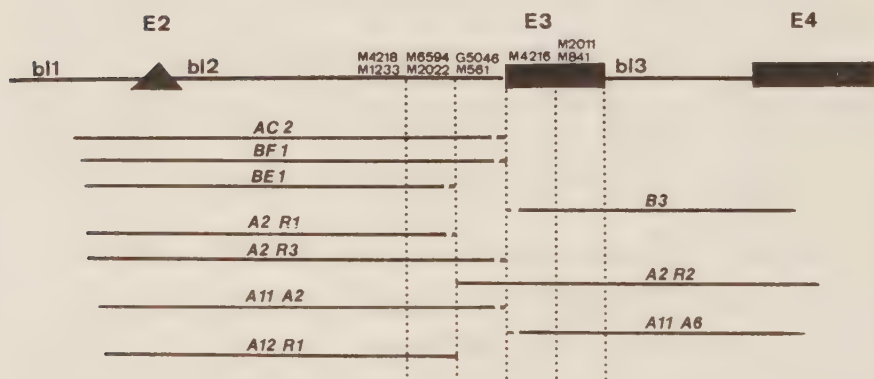


Abb.16 Zur Bestimmung der relativen Position der Mutation M561 wurde diese mit einer Reihe von ρ^- -Mutanten gekreuzt. Die Linien im unteren Teil der Darstellung deuten den Bereich an, in dem die jeweils genannte ρ^- mit der darüberstehenden cob^- -Mutante RC-Rekombinanten bildet. Wie die Darstellung zeigt, liegt M561 3' der äußersten trans-rezessiven Mutation im offenen Leserahmen, M2022, und 5' der Exon3-Mutation M4216, also im 3' geschlossenen Leserahmen von *bI2*.

Eine Rekombinationskartierung zur genaueren Lagebestimmung der Mutation liefert folgende Daten (siehe auch Abb.16) (R.J.Schweyen und P.P.Slonimski, unveröffentlicht):

	RD	RD	RC
M4216 x M561	->	4.4%	
M2011 x M561	->	7.6%	
G5091 x M561	->	2.0%	

Die Rekombinationsfrequenzen deuten darauf hin, daß die Mutation von M561 in den letzten 500-600bp von b12 lokalisiert ist.

2.3-Sequenzanalyse von M561

Bei Sequenzierung der Mutation M561 wurde ähnlich verfahren, wie bei der Bestimmung der Wildtyp-Sequenz (Abb.14): das HpaII-BamHI Fragment, welches b11 und b12 umfaßt, wurde in pBR322 ligiert. Zwei Subfragmente (BglII-MboI und MboI-BamHI) wurden in M13mp8 bzw. M13mp10 ligiert und ganz oder zum Teil (siehe Abb.14) nach der Methode von Sanger et al.(1977) sequenziert.

Damit waren die letzten 600bp von b12 aus Mutante M561 abgedeckt: bei Vergleich dieser Sequenz von M561 mit derjenigen des Wildtyps wurden 2 Unterschiede gefunden: an Position 953 war in der Mutante ein C deletiert und 310bp weiter in 3'Richtung fand sich an Position 1263 eine T->A Transversion. Die Tatsache, daß M561 eine Doppelmutante ist, steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß von M561 keine Revertanten gefunden werden, weder spontan entstehende noch nach $MnCl_2$ - oder MMS-Behandlung.

2.4_Sekundärstruktur_von_bI2

2.4.1_Prinzipien_des_Aufbaus_der_Struktur

Im Intron 4 befinden sich fast alle cis-dominanten Mutationen in den Abschnitten E/E' und R/S, was zu der Überzeugung geführt hat, daß diese Bereiche als zentraler Teil der Sekundärstruktur dieses Introns angesehen werden müssen. In Analogie zu bI4 sollte anzunehmen sein, daß cis-acting Mutationen in bI2 ebenfalls solche sensiblen Bereiche betreffen, als welche neben den oben genannten noch die hochkonservierte Struktur P/Q und, auf Primärsequenz-niveau nicht konservierte, jedoch in Basenpaarungen involvierte RNA-Abschnitte, angesehen werden.

Drei cis-acting Mutationen wurden in bI2 sequenziert:

G5046 (Jacq et al.1982)(Abb.17), eine Doppelmutante, die ca. 500bp vor dem 3'-Ende des Introns (bereits im geschlossenen Leserahmen) eine C->A Transversion und zusätzlich eine G->A Transition 8bp davon entfernt besitzt.

P366 (Gargouri et al.1984) ist eine G->A Transition, die ca. 50bp 3' von G5046 lokalisiert ist (Abb.17).

Die dritte bekannte cis-acting Mutation in bI2 ist die in dieser Arbeit sequenzierte Mutante M561; sie besitzt wie G5046 zwei mutative Veränderungen: etwa 100bp nach dem Stop-Codon des offenen Leserahmens von bI2 ist in einer Reihe von 3 C eines deletiert. Die 2. Veränderung zur Wildtyp-Sequenz, eine T->A Transversion, ist 310bp weiter in 3'Richtung lokalisiert.

Beim Aufbau einer Sekundärstruktur von bI2 sollte soweit wie möglich berücksichtigt werden, daß in cis wirkende mutative Veränderungen in erster Linie in den genannten, hochkonservierten Bereichen, dicht benachbart davon oder in gepaarten RNA-Abschnitt-

ten lokalisiert sind.

Intron 2 stellt, wie bereits erwähnt, insofern eine Ausnahme innerhalb der Gruppe I-Introns dar, als in bI2 ansonsten stark konservierte DNA-Abschnitte allenfalls mit leicht abgewandelter Basenfolge aufgefunden werden. Bei der Identifikation der konservierten Sequenzabschnitte und ihrer Verwendung als Ausgangspunkte beim Aufbau der Sekundärstruktur sind weitere Bedingungen an bestimmte Merkmale zu stellen, die die Primär- und Sekundärstruktur der Gruppe I Introns charakterisieren (siehe Abb.13c als Beispiel):

- 1) Die Reihenfolge der (mehr oder weniger gut) konservierten Bereiche ist stets $3'E \rightarrow P \rightarrow Q \rightarrow R \rightarrow E' \rightarrow S^3'$
- 2) E und E', P und Q, R und S sind über eine bestimmte Strecke jeweils komplementär, d.h. bei Abweichung der einen Sequenz vom Konsensus muß der andere Teil des Paares einen kompensatorischen bp-Austausch besitzen.
- 3) Das Paar "P/Q" bildet stets eine charakteristische Sekundärstruktur aus: einem 5-6 bp langen gepaarten Bereich folgt ein "bulge-loop" (dieser enthält 4-7 z.T. konservierte Basen) und distal folgt anschließend wieder eine gepaarte Region.
- 4) 3' des P/Q-Hybrids liegt stets eine "Hairpin-Loop"-Struktur.
- 5) weiter in 3'Richtung befindet sich nach 4-6 Basen der paarende Teil der Region R
- 6) von dort aus folgt im Abstand von mindestens 3 Basen (evtl. auch erst nach 1 oder 2 "Hairpin-Loop"-Strukturen) der Bereich E'.
- 7) Die 5'-Spleißstelle liegt in allen bekannten Fällen innerhalb einer "Hairpin-Loop"-Struktur, an der Exonsequenzen beteiligt

- Die Paarung der konservierten Struktur P/Q ist wie in allen Introns dieser Gruppe aufzufinden. Die Abweichung von der Konsensus-Sequenz, die je 10bp in P und Q umfaßt (Waring and Davies 1984) beträgt 50% für P und 60% für Q. Die Austausche im paarenden Abschnitt sind jedoch kompensatorisch, so daß perfekte Paarung weiterhin möglich ist. Beispiele für ähnlich große Abweichungen von der Konsensus-Sequenz finden sich im rRNA-Intron von *A.nidulans* (P:60% und Q:50%), im Intron der rRNA von *N.crassa* und im Intron 5b des *oxi3*-Genes von *S.cerevisiae* (P:70% / Q:50%) (Waring et al.1984). Die sehr hohe Konservierung der A-Nukleotide in dem charakteristischerweise immer vorhandenen "Loop" ist auch in bI2 beibehalten (Abb.17 und Abb.28, S.111).
- Die Paarung R/S ist in allen bisher untersuchten Introns ausnahmslos möglich. Jedoch kommen auch hier in seltenen Fällen Beispiele von Abweichungen von der ungewöhnlich stark konservierten Primärsequenz vor (Abb.18). In bI2 ist die Paarung R/S ebenfalls perfekt möglich, weicht jedoch von der meist anzutreffenden Paarung 5' UAGUC 3'/5' GACUA 3' ab: das mittlere G/C-Paar ist in bI2 gegen ein A/U-Paar ausgetauscht (und entspricht so der bI4-Sequenz in Revertante G2590/RA2).
- Die Paarung E/E' unterscheidet sich von den vorigen beiden insofern, als hier grundsätzlich keine Konservierung auf Primärsequenzniveau zu erkennen ist. In allen untersuchten Introns ist jedoch die Position dieser komplementären Abschnitte stets erhalten: Die Sequenz E befindet sich (mit 1 Ausnahme) 3-5 Basen 5' von P, E' ist im allgemeinen 3 Basen 3' von R lokalisiert. Genau dies trifft auch für bI2 zu (Abb.17). Die Paarung

Konsensus

P													Q									
11	17	13	16	10	12	14	13	18	11				14	19	15	11	9	16	12	17	16	10
A	U	G	C	U	G	G	A	A	A				A	A	U	C	A	G	C	A	G	G
U				G	A	A	A	G	U				U		C	U	U	C			C	C
7				3	6	5	5	5	5				5		3	5	7	3				7

R													S									
16	16	18		10	19	19	18	19	16	17			19	16	17	16	13	18	16	19	18	11
U	C	A	G	A	G	A	C	U	A	X	A		A	A	G	A	U	A	U	A	G	U
U			A	C									U			G						C
3				6									3		3							6

Abb.18 Dargestellt sind die konservierten Sequenzen der Gruppe I Introns. Der innerhalb der Konsensus-Sequenz unterstrichene Bereich deutet die Basen an, die gewöhnlich in die Paarung P/Q und R/S involviert sind. Die Konsensus-Sequenzen zeigen die am häufigsten vorkommenden Basen, die Zahlen darüber ihr Auftreten in 19 untersuchten Introns an. Unterhalb einiger Basen sind die häufigsten Alternativen aufgezeigt (Nach Waring et al.1984).

E/E' erstreckt sich ohne eine einzige Fehlpaarung über 8 bp.

- Benachbart zur P/Q-Paarung (zwischen Q und R) findet sich immer ein Hairpin-loop, so auch in bI2.

Nur teilweise in Einklang mit früheren Beobachtungen an bI4 steht die Tatsache, daß die cis-acting Mutationen in bI2 nicht innerhalb der stark konservierten Bereiche liegen oder in Paarungen involvierte Basen betreffen. In Abb.17 ist die Lokalisierung der bekannten mutativen Änderungen innerhalb der Sekundärstruktur aufgezeigt. Die beiden Paarungen R/S und E/E' sind in keinem Fall betroffen. Die Sequenzierung von vier cis-acting Mutationen in bI3 (siehe weiter unten) bringen den überraschenden Befund, daß diese geclustert sind in einem Bereich, der weder in bI4 noch in bI2 betroffen ist. Dies läßt die Vermutung zu, daß in verschiedenen Introns derselben Gruppe die Stabilität der Sekundärstruktur sich auf jeweils andere Bereiche stützt, die dann gegenüber

mutativen Veränderung besonders empfänglich sind. Alternativ kann angenommen werden, daß abhängig vom Sequenzkontext, bei den angewendeten Mutagenen in verschiedenen Bereichen die Häufigkeit von bp-Änderungen sehr unterschiedlich ist. Eine genaue Analyse der mutierten Abschnitte sowohl in bI4 als auch in bI3 erfolgt im Diskussionsteil.

3. Intron 3

Das Intron 3 des *cob* Genes (bI3) in mitochondrialer DNA der Hefe ist ein relativ langes Intron, das mit den Nachbar-Introns bI2 und bI4 einige Merkmale teilt: Es beginnt mit einem offenen Leserahmen (ORF), der in Phase mit dem vorangehenden Exon ist; der offene Leserahmen endet etliche hundert Basenpaare vor dem 3'-Ende des Introns (Lazowska et al.1981 und J.Lazowska, personl. Mittlg.). Neben einigen cis-dominanten Mutationen konnten zwei trans-rezessive Mutationen bI3 zugeordnet werden (Jacq et al.1982, Lamouroux et al.1980). Das Vorkommen von trans-rezessiven Mutationen, sowie die Polarität des Spleißprozesses (Schmelzer et al.1981) unterstützen die Vermutung, daß Intron 3 ebenso wie Intron 2 und 4 für ein "trans-acting" Produkt, eine sogenannte Maturase, codiert.

Der Vergleich der Randsequenzen von bI3 in Hefe und dem einzigen *cob*-Intron in *Aspergillus nidulans* (A.n.) zeigt, daß diese beiden Introns eine beträchtliche Nukleotidsequenzhomologie besitzen und daß beide an exakt derselben Position im für Apocytochrom b codierenden Bereich inseriert sind (Lamouroux et al.1980). Die Sequenzhomologie erstreckt sich auch in den im Intron befindlichen Leserahmen (Lazowska und Slonimski, wie zitiert in Waring et al.1982). Das *cob*-Intron von *Aspergillus* kann eine RNA-Sekundärstruktur ausbilden (Michel et al.1982), wie sie typisch ist für den Großteil (i.e. Gruppe I) der mitochondrialen Introns und das rRNA-Intron in *Tetrahymena* (Davies et al.1982); seine Sequenzhomologie zu *cob*-Intron 3 läßt vermuten, daß letzteres ebenfalls zur Gruppe I gehört.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die gesamte Sequenz von bI3 des

Wildtyp-Stammes 777-3A bestimmt und die Sequenzänderungen von 4 cis-dominanten Mutationen im 5'-Teil dieses Introns. Alle vier Mutationen betreffen eine kurze Nukleotidsequenz, die, abgesehen von nur wenigen Abweichungen, allen Introns der Gruppe I gemeinsam ist. In der typischen Sekundärstruktur bildet dieser Bereich eine einzelsträngige Region, der dem P/Q-Hybrid des zentralen Teils der RNA-Sekundärstruktur eng benachbart ist.

3.1_Nukleotidsequenz_von_cob-Intron_3

Die Strategie der Sequenzierung von Intron 3 des *cob*-Genes und die erhaltene Nukleotidsequenz des Wildtypstammes 777-3A sind in Abb.19 und 20 angegeben. Das Intron ist 1696 bp lang und hat einen offenen Leserahmen (*orf*) von 1045 bp, der für ein potentielles Protein mit 348 AS codiert. Dieser offene Leserahmen hat etliche Eigenschaften mit den *orfs* von Intron 2 und 4 des *cob*-Genes gemeinsam, die sehr wahrscheinlich für Proteine, die sog. Maturasen, codieren, die für die Excision (mindestens) des entsprechenden Introns notwendig sind: Der offene Leserahmen von b13 ist in Phase mit dem vorangehenden Exon; der G+C-Gehalt ist sehr niedrig (13.7%) und 68% der Codons bestehen ausschließlich aus A+U, was zu einem Vorherrschen von Phe-, Leu-, Met-, Tyr-, Asn- und Lys-Resten in dem hypothetischen Protein führt. Das von diesem Leserahmen translatierte Protein ist basisch und hydrophob. Sein zentraler Teil zeigt zwei Blöcke von Aminosäuren, bezeichnet als konservierte Dekapeptide in Waring et al.1982, "LAGLI" und "DADG" in Hensgens et al.1983 und P1 und P2 in Michel et al.1982 (siehe Abb.20), die charakteristisch sind für Proteine, die von zahlreichen Introns der Gruppe I codiert werden.

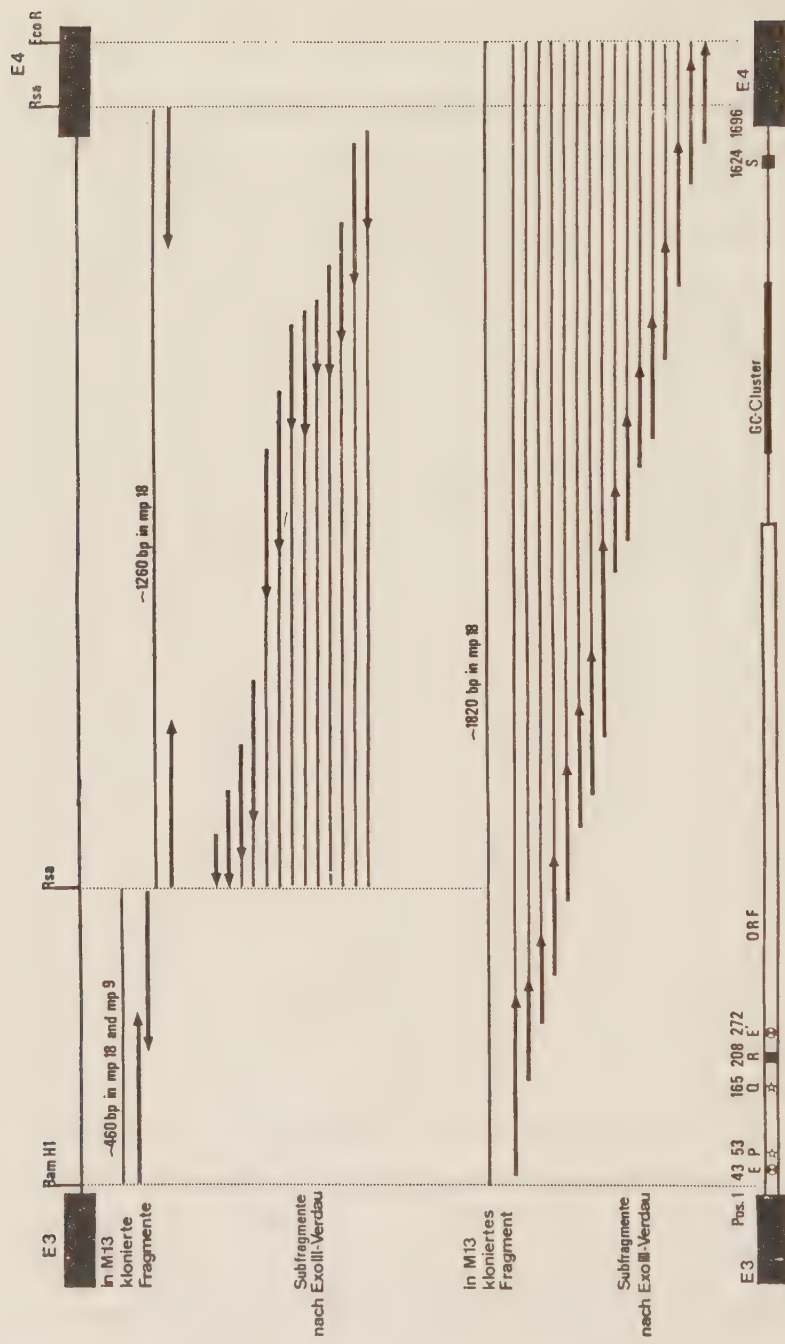


Abb.19 Strategie der Sequenzierung von *cob* Intron 3

Wildtyp: Ein BamHI-HindIII-Fragment aus dem Stamm 777-3A von ca. 3kb Länge wurde in pBR322 kloniert. Die folgenden Subfragmente wurden im Bakteriophagen M13 (Messing 1983) kloniert und nach der Dideoxymethode (Sanger et al.1977) sequenziert: BamHI-RsaI, ca. 460bp, wurde in beiden Orientierungen (in M13mp18 und M13mp19) ligiert; RsaI-RsaI, ca. 1250bp, wurde ebenfalls in beiden Orientierungen in M13mp18 und BamHI-EcoRI, ca. 1820bp, in M13mp19 ligiert. Die beiden letzteren Fragmente (1250bp und 1820bp) wurden mit Exonuclease III inkubiert und nach anschließender S1-Behandlung wurden die verkürzte Fragmente enthaltenden Vektoren M13mp18 und M13mp19 religiert. Es wurde so eine Schar von zunehmend kürzeren Fragmenten erhalten, die in unterschiedlicher Orientierung in den Vektoren inseriert waren. Die sequenzierten Bereiche sind durch dicke Linien angedeutet.

Mutanten: Eine ähnliche Strategie wurde bei der Klonierung von b13 mtDNA der Mutanten M181, M811, M1392 und M7793 angewandt. Die BamHI-RsaI-Fragmente wurden von beiden Seiten sequenziert, während vom RsaI-RsaI-Fragment nur die 5'-proximalen 300bp bestimmt wurden.

Der unterste Teil der Abbildung zeigt eine schematische Karte von *cob*-Intron 3 und den flankierenden Exons, die nach der Sequenz von b13 (Abb.20) gezeichnet wurde. Die Abschnitte, welche die zentralen Hybride der RNA-Sekundärstruktur bilden (vgl. Abb.22a) sind angedeutet: E und E', P und Q, R und S. Positionszahlen geben (in bp) die Entfernung vom 5' Ende des Introns wieder. Der offene Leserahmen (orf) ist durch einen langen, offenen Balken, die Serie der palindromen GC-Cluster durch einen schmalen, schwarzen Balken wiedergegeben.

Abb.20 Nukleotidsequenz von *cob*-Intron 3

Die gezeigte Sequenz ist die des nichttranskribierten Stranges. Die Sequenzen von Exon 3 und des Anfangs von Intron 3 bis zur BamHI-Schnittstelle wurden aus Lazowska et al.1981 aufgenommen. Die Aminosäurezuordnung erfolgte gemäß dem genetischen Code der Hefe-Mitochondrien (Bonitz et al.1980, Hudspeth et al.1982). Die Exonsequenzen sind unterstrichen. V zeigt die Spleißpunkte an. Die Sequenzen E,P,Q,E',R und S, die an der Bildung der RNA-Sekundärstruktur beteiligt sind, wurden eingerahmt. Die Sequenzen, die für die konservierten Dekapeptide codieren, sind durch unterbrochene Linien markiert.

ASP ILE VAL SER TRP LEU TRP GLY GLY PHE Asn Met Glu Asp Pro Tyr Tyr Ser Asn Met
 -29 GAT ATT GTA TCT TGA TTA TGA GGT GGG TTT AAT ATA GAG GAT CCA TAT TAT AGT AAT ATA
 Met Leu Asn Lys Ser Val Leu Cys Trp Asn Ile Phe Ile Trp Met Met Asn Tyr Tyr Ile
 +31 ATA TTA AAT AAT TCT GGT TTA TGC TGA AAT ATC TTC ATT TCA ATA ATA AAT TAC TAT ATT
 Ile Gln Leu Ile Ile Tyr Asn Asn Met Ile Trp Asn Lys Asn Asn Met Val Lys Met Phe
 +91 ATT CAA TTA ATT ATT TAT AAT AAT ATA ATT TGA AAT AAA AAT ATA ATT TGA AAT AGA TAT TTT
 Ile Met Arg Arg Lys Leu Ala Val Ile Asn Met Tyr Met Tyr Met Lys Leu Ile Ile Gln
 +151 ATT ATA AGA AGA AAT TTA GCA GTA ATT AAT ATA TAT ATA TAT ATA AAA TTA ATT ATT CAG
 Arg Thr Tyr Ser Tyr Tyr Met Asn Asn Thr Ile Ile Tyr Asp Lys Asn His Lys Leu Asn
 +211 AGA CTT TAT AGT TAT TAT AAT AAT AAT ACT ATT TAT TAT GAT AAA AAT CAT AAA AGA GAT
 Thr Asn Asn Pro Ile Tyr Ala Tyr Ile Val Gly Leu Phe Glu Gly Asp Gly Trp Ile Thr
 +271 ACA GAT AAT CCT ATT TAT GCA TAT ATT GTT GGT TTA TTT GAA GGA GAT GGT TGA ATT ACT
 Ile Ser Lys Lys Gly Lys Tyr Leu Leu Tyr Glu Leu Gly Ile Glu Ile His Ile Arg Asp
 +331 TAT AAA ATA AAA GAT GGT ACT ATT AAA GAA ATA TGT AAA TTT AAT ATA CAT AAT AAA AAT
 Ile Gln Leu Leu Tyr Lys Ile Lys Asn Ile Leu Gly Ile Gly Lys Val Thr Ile Lys Lys
 +391 ATT CAA TTA TTA TAT AAA ATT AAA AAT ATT TTA GGT ATT GGT AAA GTA ACA ATT AAA AAA
 Leu Lys Met Lys Asp Gly Thr Ile Lys Glu Met Cys Lys Phe Asn Val Arg Asn Lys Asn
 +451 TAT AAA ATA AAA GAT GGT ACT ATT AAA GAA ATA TGT AAA TTT AAT ATA CAT AAT AAA AAT
 His Leu Lys Asn Ile Ile Ile Pro Ile Phe Asn Lys Tyr Pro Met Leu Thr Asn Lys His
 +511 CAT TTA AAG AAT ATT ATT ATT CCT ATT TTT AAT AAA TAT CCT ATA TTA ACT AAT AAA CAT
 Tyr Asp Tyr Leu Tyr Phe Lys Asp Asn Leu Leu Lys Asp Ile Lys Tyr Tyr Asn Asp Leu
 +571 TAT TAT TAT TTA TAT TAT AAA GAT AAT TTA TTA AAA GAT ATT AAA TAT TAT AAT GAT TAT
 Ser Tyr Tyr Leu Arg Pro Ile Lys Pro Phe Asn Thr Leu Glu Asp Ile Leu Asn Lys Asn
 +631 TCT TAT TAT TTA CGT CCT ATT AAA CCA TTT AAT ACT CTT GAA GAT ATT TTA AAT AAA AAT
 Tyr Phe Ser Ser Trp Leu Ile Gly Phe Phe Glu Ala Lys Ser Cys Phe Ser Ile Tyr Lys
 +691 TAT TTT TCT TCA TGA TTA ATT GGT TTT TTT GAA GCT AAA AGT TGT TTT AGT ATT TAT AAA
 Pro Met Asn Lys Lys Met Lys Thr Ala Ser Phe Glu Val Ser Met Asn Asn Asn Met Glu
 +751 CCT ATA AAT AAA AAA ATA AAA CTT GCT AGT TTT GAA GTA TCT ATA AAT AAT AAT ATA GAA
 Val Met Leu Ala Ile Lys Ser Tyr Leu Lys Ile Asn Asn Asn Ile Tyr Met Asn Glu Phe
 +811 GTT ATA TTA GCT ATT AAA TCA TAT TTA AAA AAT AAT AAT AAT ATT TAT ATA AAT GAA TTT
 Asn Asn Ser Lys Met Thr Thr Lys Ser Ile Asn Asp Ile Lys Asn Val Val Met Phe Ile
 +871 AAT AAT TCA AAA ATA ACA CTT AAA AGT ATT AAT GAT ATT AAA AAT GTT GTA ATA TTT ATT
 Asn Asn Asn Pro Ile Lys Leu Leu Gly Tyr Lys Lys Leu Gln Tyr Leu Leu Phe Leu Lys
 +931 AAT AAT AAT CCT ATT AAA TTA TTA GGT TAT AAA AAA TTA CAA TAT TTA TTA TTC TTA AAA
 Asp Leu Arg Thr Ile Thr Lys Tyr Asn Asn Tyr Phe Lys Ile Pro Ser Lys Tyr ***
 +991 GAT TTA CGT CTT ATT CTT AAA TAT AAT AAT TAT TTT AAA ATT CCT TCT AAA IAT TAA TCT
 +1051 TATATAAAATATAATAATATATATTTATATATTTATATATAATATATAACAAAATATAATTTATATATAATTTATTT
 +1131 ATAAATATAGTCCGGCCCGCCCGGGGGGGGGCGGACCCCGAAGGAGTGAGGGACCCCTCCCTATACTCTATACTAA
 +1211 CGGGAGGGGGACCGTATCCCTTTTTATTTTTAAGAAGGAGTGAGGGACCCCTCCCTAATGGGAGGGGGACCGAACCCCG
 +1291 AAGGAGTTTAATTATATATATAATATATTTATCAATAAATAATTCCTTTGAACTATTTATTTATTTATTTATTTATTT
 +1371 TTCTCCTTCATTATTAATTTTTATTAATAATTAATCTTATCATTTTATGTTATTTATTTCTATTTTGGAGTATCGAA
 +1451 ACTATAAATAAAAAGTATAATTTTATAAATTATTTATGATTATAAATAAGAAATAAAAACTTTAGAAGTAATATT
 +1531 TATCTTTTTTTTTTATAAATAAATATTATGATTAATATATAATCATTTATAAATATTTATATATAATTATATATATATAC
 +1611 ATAAATAGGATTAGATATAGTCCGAACAAATAGTGATATTTGATAATAGTTTTCAAATATGTAACATTTAAACATT
 SER VAL SER ASN PRO LEU ILE GLN ARG PHE PHE
 +1691 AAAAGCTCA GTA TCT AAC CCT CTA ATC CAG AGA TTC TTT

3.2 Vergleich von Hefe *cob*-Intron 3 mit dem einzigen Intron in *cob* bei *Aspergillus nidulans*

Im 5'-terminalen Bereich der Sequenzen von bI3 und dem *cob* Intron in *Aspergillus nidulans* (AnCOB) wurde eine bemerkenswerte Homologie auf Nukleotidsequenzniveau beobachtet (Lazowska et al.1981). Es zeigte sich, daß diese Homologie weit in den offenen Leserahmen hineinreicht (Lazowska und Slonimski, wie zitiert in Waring et al.1982). Ein Vergleich der kompletten Sequenz beider Introns läßt ein Homologiemuster, wie in Abb.21 dargestellt, erkennen.

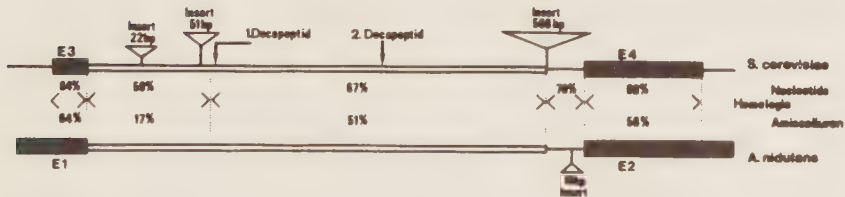


Abb.21 Homologie der Nukleotid- und Aminosäuresequenz zwischen *cob*-Intron 3 in Hefe und dem einzigen *cob*-Intron in *Aspergillus nidulans*. Schwarze Balken: flankierende Exons; offene Balken: in Introns gelegene offene Leserahmen. Nähere Einzelheiten im Text.

Der Vergleich der Introns in A.n. und Hefe über die gesamte Sequenz zeigt eine beträchtliche Homologie, abgesehen von 4 Blöcken, die als Insertionen/Deletionen betrachtet werden können. Alle vier Blöcke enthalten "inverted repeat"-Sequenzen. Die kleineren sind an die typische Kernstruktur der Klasse I Introns zusätzlich angelagerte "Hairpin"-Strukturen (vgl. Abb.22), wäh-

rend das 568 bp-Insert unmittelbar auf den offenen Leserahmen folgt und dadurch lediglich den großen Loop des gefalteten Introns erweitert. Dieses große Insert enthält 3 palindrome GC-Cluster, ähnlich denen der gängigen Klasse solcher Cluster, die transponible Elemente in Hefe-mtDNA darstellen mögen (Sor und Fukuhara, 1982).

Im offenen Leserahmen beträgt die Nukleotidsequenzhomologie durchschnittlich 65%. Interessanterweise erreicht die Homologie auf Aminosäureniveau nicht diesen hohen Wert; der größte Teil des 3'-Endes des *gcf*₂, der mit dem ersten Dekapeptid beginnt, besitzt eine Homologie von 51% auf Aminosäureniveau, was noch immer anzeigt, daß beide Sequenzen eng verwandt sind, wohingegen der 5'-Teil mit nur 17% Aminosäurehomologie (bedingt durch Insertionen/Deletionen) auf keinerlei Verwandtschaft schließen läßt.

Das bemerkenswerte Phänomen von hoher Nukleotidsequenz- aber geringer Aminosäuresequenzhomologie scheint anzudeuten, daß im 5'-Teil des offenen Leserahmens keine Selektion besteht als die, einen offenen Leserahmen zu erhalten, um die Translation über das vorangehende Exon hinaus zu ermöglichen. Das steht in Übereinstimmung mit und unterstützt eine frühere Hypothese über die Expression des Intron 4 *gcf* (Weiss-Brummer et al. 1982). Danach besteht die funktionelle Maturase aus dem C-terminalen Teil des Intron *gcf*, beginnend etwa im Bereich des ersten konservierten Dekapeptids. Der vorangehende Teil des *gcf* dient lediglich dazu, den für die Maturase codierenden Leserahmen mit dem 5' liegenden Exon zu verknüpfen. Das erlaubt die Synthese eines Exon-Intron Fusionsproteins, von dem der C-terminale Teil proteolytisch abgeschnitten wird und dessen aminoterminalen Fragment dann das

funktionelle Intron-codierte Produkt bildet.

3.3_Sekundärstruktur_von_bI3

Abb.22a zeigt ein Modell der Sekundärstruktur von Hefe *cob* Intron 3. Die Abbildung stellt die Hybride R/S, P/Q, E/E' als Schlüsselemente bei der Ausbildung der RNA-Faltung dar. Ihre herausragende Rolle im Aufbau der Gruppe I-Introns ist offensichtlich und zwar aufgrund der Tatsache, daß die Sequenzen R, S, P und Q in allen Introns dieser Gruppe stark konserviert sind (Waring et al.1982, Michel et al.1982) und daß cis-dominante Mutationen, die den Spleißvorgang in bI4 stören, in den Sequenzen R, S, E und E' geclustert sind. Etliche der anderen Hybride sind optional oder variabel in ihrer Größe. Dieses trifft auch für die homologen *cob* Introns in Hefe und *Aspergillus* zu: Die kleineren Inserts von 22bp und 18bp (siehe Abb.22) vergrößern das Hybrid lateral von P/Q und das am meisten 3'-ständige Hybrid (Abb.22a). Das 51bp Insert vergrößert den Spacer zwischen den Hybriden E/E' und R/S, der in den meisten Introns nur 3bp lang ist. Das Insert fügt 2 kleine zusätzliche Hybride (gezeigt als Insert in Abb.20a) in das Grundmuster der Sekundärstruktur ein.

Die Ausbildung dieser Sekundärstruktur scheint notwendig, jedoch nicht hinreichend zu sein, um präzises Spleißen zu ermöglichen. Davies et al.(1982) haben das Modell einer sog. "Internal guide sequence" (IGS) vorgeschlagen; diese besteht aus einer kurzen Sequenz am äußersten 5'-Ende des Introns, welche mit beiden das Intron flankierenden Exons paaren kann und diese dadurch in unmittelbare räumliche Nähe bringt. Bei 18 von 24 untersuchten Introns der Gruppe I ist die Ausbildung einer IGS, die in allen

b

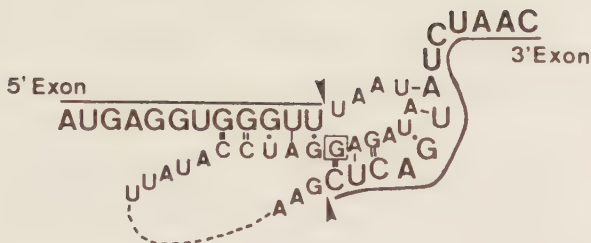


Abb.22a) Sekundärstrukturmodell von cob-Intron 3 RNA

Exon-Sequenzen sind mit dicken Buchstaben gezeichnet; die Pfeile deuten die Spleißpunkte an. Die zentralen Hybridstrukturen, die in allen Gruppe I-Introns konserviert sind (Michel et al.1982, Waring et al.1982) sind mit E/E' und R/S markiert (diese entsprechen box9c/box9 und box9/box2 in bI4). 1 und 2 markieren die Positionen, wo die im unteren Teil gezeigten Hybridstrukturen einzufügen sind. Der Hauptteil des Introns, ca. 1300bp, wurde weggelassen; dieser trägt nichts zum Aufbau der typischen Sekundärstruktur der Gruppe I Introns bei. Die durch die Mutationen M181(+1A), M811, M1392, M7793 (alle -1A) betroffenen Sequenzen sind durch *** markiert. Die jeweils 3. Base der seltenen Codons (siehe Diskussion) ist eingerahmt.

Drei Inserts modifizieren die Sekundärstruktur des Introns bI3 im cob Intron von *A. nidulans* (AnCOB).

a)+22bp in bI3 vergrößert das Hybrid lateral von P/Q (vgl. 2 und 2').

b)+51bp in bI3 fügt 2 hairpin-loops zwischen E/E' und R/S ein (vgl. 1).

c)+18bp in AnCOB vergrößert das am meisten 3'ständige Hybrid (vgl. 3 und 3').

b) Modell der sog. "Internal guide sequence" von bI3

Exonanteile sind mit dicken Buchstaben gezeichnet; Pfeile markieren die Spleißpunkte; die unterbrochene Linie symbolisiert nahezu die Gesamtheit von bI3; lediglich die äußersten 5' und 3' liegenden bp sind eingezeichnet.

auffallende strukturelle Ähnlichkeit hat, möglich (Waring and Davies, 1984). Abb.22b zeigt das Modell der IGS von bI3: wie aus der Darstellung hervorgeht, kommen sich bei Bildung dieser Struktur die Exonenden bis auf die Distanz einer Phosphodiesterbindung nahe.

3.4 Sequenzänderungen in 4 cis-dominanten bI3 Mutationen

Vier cob^- -Mutationen, M181, M811, M1392 und M7793 wurden für die Sequenzierung ausgewählt. Vorangehende Untersuchungen hatten diese als bI3-Mutationen charakterisiert (Bechmann et al.1981), die die Excision von bI3 aus der Vorläufer-mRNA nicht mehr ermöglichen (Schmelzer et al.1981). Paarweise Kreuzungen ($cob^- \times cob^-$) dieser 4 cob^- -Mutanten ergaben keine Rekombinanten zum Wildtyp, was vermuten läßt, daß alle 4 denselben kurzen Sequenzabschnitt betreffen. Kreuzungen mit der Exon 3-Mutante M2011 ergaben 1-2% Rekombinanten; das zeigt an, daß die Intronmutationen 200-300 bp von der Exonmutation entfernt liegen.

Die Sequenzierung erfolgte nach der Strategie, wie sie in Abb.19 dargestellt ist. Dadurch wurde die Sequenz der ersten 700 bp am 5'-Ende von bI3 von jeder der 4 Mutanten erhalten. Die Sequenzen aller 4 Mutanten zeigten eine Änderung im selben Abschnitt: in der Mutante M181 wurde in einer Reihe von 4 Δ ein zusätzliches Δ eingefügt, in den Mutanten M811, M1392 und M7793 wurde in der Reihe von 4 Δ eines deletiert. Keine andere Änderung wurde in den 700 bp, deren Sequenz bestimmt wurde, aufgefunden. Die Sequenzdaten stimmen mit der genetischen Kartierung der Mutationen gut überein und lassen somit keinen Zweifel daran, daß die Insertionen/Deletionen in dieser Reihe von Δ -Resten den cob^- -Phänotyp der Mutanten verursachen.

In der Sekundärstruktur ist der mutativ veränderte Sequenzabschnitt Teil eines Einzelstrangbereiches, eines internen Loops, der dem P/Q-Hybrid benachbart ist (Abb.22a). Die Sequenzkonservierung ist nicht beschränkt auf die gepaarten Bereiche von P/Q, sondern erstreckt sich auch in den internen Loop, der in den

genannten bI3-Mutanten verändert ist (ausführliche Diskussion siehe S.110). Beides, die Sequenzkonservierung und das Vorhandensein von Mutationen charakterisieren diese interne Loop-Struktur als ein wichtiges Element beim RNA-Spleißen.

3.5 Revertanten der box10-Mutante M811

Zur Induktion von Revertanten wurde die Mutante M811, wie in Material und Methoden beschrieben, mit $MnCl_2$ und MMS behandelt. Jeweils ca. 100 Revertanten wurden isoliert und auf das Vorhandensein einer extragenischen Suppressormutation getestet. Die Kreuzung sämtlicher Revertanten mit dem Wildtyp (analog wie in Abb.10/I, S.47) und der Test auf Atmungskompetenz von jeweils ca. 600 diploiden Nachkommen ergab keine atmungsdefekten Rekombinantten, was gegen das Vorhandensein einer Suppressormutation auf dem mitochondrialen Genom spricht, die weiter als etwa 100bp von der Ursprungsmutation entfernt liegt.

Nach Ethidiumbromid-Behandlung der Revertanten, die zum Verlust des mitochondrialen Genoms führt, wurden diese mit den Ausgangsmutanten gekreuzt. Unter den 200 Revertanten wurde eine einzige gefunden (M811/RG1) (aus der MMS-Mutagenese), die nach der Kreuzung wieder atmungskompetente Nachkommen bildete. Das Ergebnis kann nur so erklärt werden, daß eine (dominante) Suppressormutation auf dem Kerngenom der Revertante die bI3-Mutation in der Diploiden wieder zu supprimieren vermag. Zur weiteren Untersuchung wurden die atmungskompetenten, diploiden Zellen sporuliert. Die anschließende Tetradenanalyse ergab eine Aufspaltung von 2:2 (RC:RD). Dies bestätigt die Vermutung auf einen kerncodierten, supprimierenden Faktor.

4. GC-Cluster

Die mitochondrialen Genome unterschiedlicher Wildtyp-Stämme zeigen eine starke Variation hinsichtlich Größe und Restriktionsmuster. Polymorphe Variationen betreffen vor allem die An- oder Abwesenheit von Introns (Mahler 1983, Review), von intergenen Sequenzen (Cobon et al. 1982) und von sog. GC-Clustern (Dujon 1980, Sor and Fukuhara 1982, 1983). Letzteres sind 25-75 bp lange Regionen (mehr als 100 wurden auf dem mitochondrialen Genom von *S. cerevisiae* identifiziert) von ungewöhnlich hohem GC-Gehalt (50-90%), die sich zu charakteristischen "Hairpin-Strukturen" falten lassen. Die meisten dieser GC-Cluster, deren Funktion bislang unbekannt ist, sind außerhalb der Gene in A+T-reichen Spacer-Regionen lokalisiert. Es wurde vermutet, daß den GC-Clustern die Eigenschaft innewohnt, sich selbstständig, ähnlich den transponiblen Elementen, auf der mtDNA zu verbreiten (Sor und Fukuhara 1982). Die Konstanz der terminalen Sequenzen (TAGT und AAGGAG) mag eine Rolle bei der Insertion spielen. Die AT-reichen Sequenzen, die auf dem mitochondrialen Genom vorherrschend sind, sind vermutlich ein bevorzugtes Ziel der Insertion (oder die GC-Cluster werden nur dort toleriert), da GC-Cluster meist innerhalb solcher Sequenzen gefunden werden.

4.1 GC-Cluster als mobile Elemente

Die Anordnung der in Intron 3 sequenzierten GC-Cluster ist in Abb. 23 gezeigt. Drei GC-Cluster sind hintereinander im geschlossenen Leserahmen von bI3 ab Pos. 1140 inseriert. Alle 3 GC-Cluster haben dieselbe Orientierung. Sie besitzen alle die charakteristische terminale Sequenz am 3'-Ende (AAGGAG), jedoch findet sich auffälligerweise nur am Beginn des ersten Clusters die sonst

Überall auftretende charakteristische 5'-terminale Sequenz TAGT;
diese fehlt in den Clustern 2 und 3.

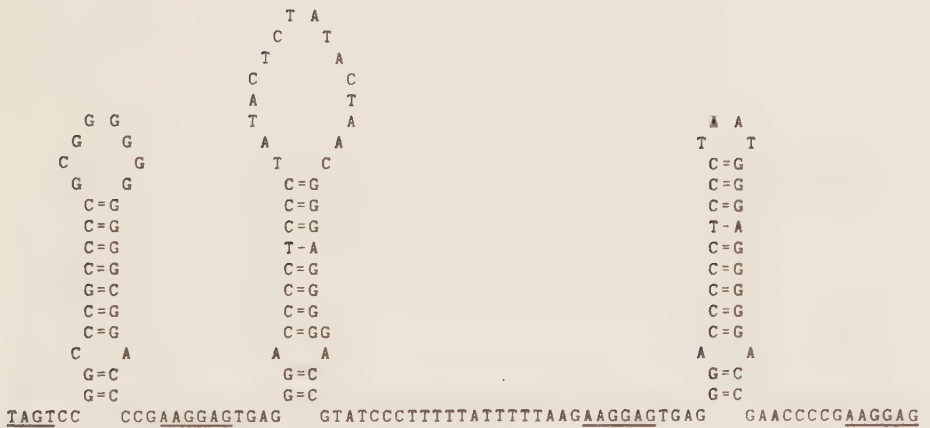


Abb.23 Sekundärstrukturmodell der 3 GC-Cluster im geschlossenen Leserahmen von bI3 im Stamm 777-3A. Die charakteristischen Anfangs- (TAGT) und Endsequenzen (AAGGAG) sind unterstrichen.

Vergleichende Untersuchungen von Sequenzen mit und ohne GC-Cluster (Weiller et al., in Vorbereitg.) haben zu der Schlußfolgerung geführt, daß die Sequenz TAG, die in allen GC-Clustern am 5'-Ende gefunden wird, nicht der Sequenz des Clusters zugeordnet werden darf: diese ist auch in den entsprechenden Sequenzen ohne GC-Cluster enthalten. Dieses TAG scheint, neben anderen Merkma-

len, welche die entsprechende Stelle als "target-site" geeignet machen, von den mobilen GC-Clustern als Zielsequenz erkannt zu werden. Auffälligerweise finden sich die letzten 2 Basen der "target-Sequenz", nämlich AG, stets am Ende des GC-Clusters (als Teil der Konsensus-Sequenz AGGAG): dies erinnert an den Mechanismus der Integration von mobilen Elementen bei Prokaryonten, wo die Erkennungsstelle beim Integrationsprozess durch einen versetzten Schnitt partiell verdoppelt wird.

Die Tatsache, daß die "target-site" TAG bei den GC-Clustern im Intron 3 nur am Beginn des 1.Clusters zu finden ist, ließe sich so erklären, daß im ursprünglichen Zustand ohne GC-Cluster die TAG-Zielsequenz von Cluster 3 erkannt wurde. Nach dessen Insertion war am 5'-Ende des Clusters das TAG erhalten geblieben. Dieses wurde dann nacheinander von Cluster 2 und 1 als Zielsequenz erkannt. Die Reihenfolge der Insertion der GC-Cluster wäre demnach 3 -> 2 -> 1.

Zur Unterstützung oder Widerlegung dieser Hypothese wurde der Bereich im Intron 3, wo die GC-Cluster inseriert sind, in 12 unterschiedlichen Stämmen näher untersucht. Im Einklang mit der oben genannten Hypothese sollten, falls nicht alle 3 GC-Cluster gleichzeitig in den untersuchten Stämmen inseriert sind, keines oder nur Cluster 3 oder Cluster 2 und 3 inseriert sein (evtl. auch zusätzlich neue GC-Cluster). Jede andere Kombination würde der dargestellten Hypothese widersprechen.

4.2 Strategie zur schnellen Identifikation der Anzahl der GC-Cluster in b13 in 12 verschiedenen Stämmen

Von zwölf Stämmen wurde mitochondriale DNA präpariert (jeweils 2-3 μ g). Es genügte eine relativ grobe Präparationsmethode, da Verunreinigungen von Kern-DNA nicht wesentlich störten (Mini-Präp, siehe Material und Methoden). Folgende Stämme wurden verwendet.

DL 1	RM 590-9D
DBY 746	D8-25A
DBY 747	KL14-4A
FL 100	IC8
FM 9a	SM11-6C
777-3A	PB2-1C

Die Restriktionsenzyme, mit denen Gesamt-mtDNA geschnitten wurde, waren so gewählt worden, daß aus der Länge eines definierten Fragmentes auf die Anzahl der GC-Cluster in b13 geschlossen werden konnte. Wie aus Abb.24 ersichtlich, schneidet HpaII nur im 1. GC-Cluster. Daher wird bei Abwesenheit des 1. GC-Clusters (und evtl. weiterer) das Fragment HpaII-EcoRV vergrößert sein. Das Umgekehrte ist der Fall bei dem Fragment AluI-EcoRV: falls irgendeines der GC-Cluster fehlt, wird dieses Fragment verkürzt sein.

Von je 1 μ g DNA wurden folgende Restriktionen durchgeführt:

I. HpaII/EcoRV

II. AluI/EcoRV

Die geschnittene DNA wurde auf 1,5%igen Agarosegelen aufgetrennt und anschließend mit einem radioaktiv markierten Fragment, das die Intron 3-Sequenz 3' von den GC-Clustern enthielt, hybridisiert. Dieses Fragment war bereits bei der Sequenzierung von Wildtyp-Intron 3 durch ExonukleaseIII-Abbau des in M13 ligierten

EcoRI-BamHI-Fragmentes gewonnen worden (Abb.19, S.72). Der Abbau erfolgte von der BamHI Schnittstelle aus so weit, daß gerade sämtliche GC-Cluster verloren gegangen waren (Abb.24). Die Abwesenheit der GC-reichen Sequenzen im markierten Fragment war notwendig, um Kreuzhybridisierung mit anderen GC-Clustern auf dem Genom zu vermeiden.

Es war Hybridisierung mit 2 bzw. 3 Banden zu erwarten (s. Abb.24):

a) Bei Restriktion mit HpaII und EcoRV

mit dem HpaII/EcoRV (enthält die GC-Cluster) und
dem EcoRV/HpaII Fragment

b) Bei Restriktion mit AluI und EcoRV

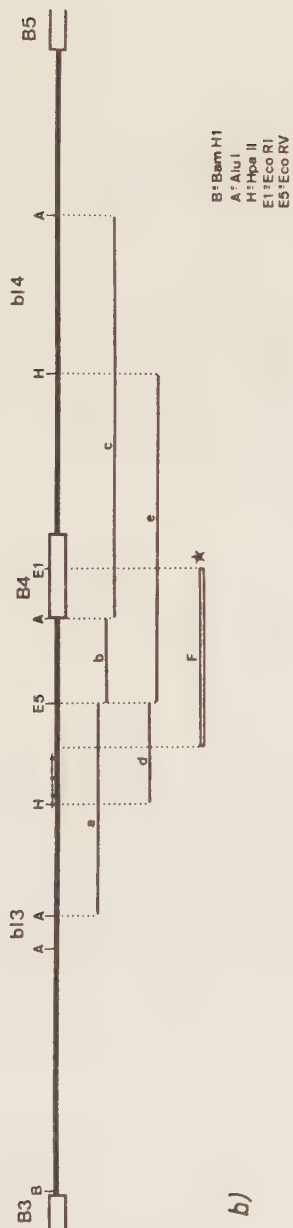
mit folg. Fragmenten: AluI/EcoRV (enthält die GC-Cluster)
EcoRV/AluI
AluI/AluI

Es war zu beachten, daß, außer bei 777-3A und K114-4A nicht bekannt war, ob der Stamm ein langes oder kurzes cgb-Gen hat, d.h. ob Intron 1, 2 und 3 vorhanden sind oder nicht. Bei Abwesenheit der ersten 3 Introns war Hybridisierung nur mit jeweils einem Fragment zu erwarten:

Bei der Restriktion Eco/AluI mit einem AluI/AluI Fragment (1314bp).

Bei der Restriktion EcoRV/HpaII mit einem HpaII/HpaII Fragment (1558bp).

a)



b)



Abb. 24 Schematische Darstellung der Fragmente, deren Auftreten im Southern-Experiment erwartet wird.

a) oben ist die physische Karte der cob-Region von Exon 3 bis Exon 5 angegeben. Die Schnittstellen der benutzten Restriktionsenzyme sind durch Pfeile markiert (A = AluI, B = BamHI, E5 = EcoRV, E1 = EcoRI, H = HpaII). Offene Balken markieren Exons, die durchgezogenen Linien entsprechen den Intronanteilen; GC-Cluster sind durch Pfeile symbolisiert.

Fragmente a-c entstehen nach Restriktion mit AluI/EcoRV; Fragmente d-e entstehen nach Restriktion mit HpaII/EcoRV;

Der mit * gekennzeichnete Balken gibt die Lage des zur Hybridisierung verwendeten, radioaktiv markierten DNA-Fragmentes an.

b) Die Karte zeigt die kurze Form des cob-Genes; hier wird nach den beiden oben genannten Restriktionen nur jeweils ein Fragment erwartet, welches mit dem heißen Fragment hybridisiert. Von letzterem ist nur der dem Exon entsprechende Teil eingezeichnet.

Die Länge des EcoRV/HpaII- und des EcoRV/AluI-Fragmentes war für den Fall, daß alle drei GC-Cluster in bI3 anwesend sind, im Stamm 777-3A (Sequenz bekannt) und KL14-4A, wovon eine detaillierte Restriktionskarte der bI3-Region angefertigt wurde (Daten nicht gezeigt), bekannt. Sie beträgt für das EcoRV/HpaII-Fragment 301bp und für das EcoRV/AluI-Fragment 625 bp. Samtliche zu erwartenden Fragmente und deren genaue Größe sind Tab.II zusammengestellt. Die aktuellen Ergebnisse der Hybridisierung zeigt Abb. 25.

	Restriktion	
	HpaII/EcoRV	AluI/EcoRV
bI3 nicht vorhanden	HpaII-HpaII:1558bp	AluI-AluI:1314bp
bI3 vorhanden		
3GC-Cluster (wie in 777-3A)	HpaII-EcoRV:301bp EcoRV-HpaII:962bp	AluI-EcoRV:625bp EcoRV-AluI:251bp AluI-AluI:1190bp
GC-Cluster 1 und evtl. zusätzl. fehlen	ca.4400bp 962bp	500-600bp 251bp 1190bp
GC-Cluster 1 vorhanden; andere fehlen	200-260bp 962bp	500-600bp 251bp 1190bp

Tabelle II: Aufgelistet sind Größe und Anzahl der Fragmente, die mit der heißen I3-Probe ein Signal geben sollten.

4.3-Ergebnis der Southern-Hybridisierung mit 12-Stämmen

Wie aus Abb.25 ersichtlich, besitzen bei der Restriktion HpaII/EcoRV 5 Stämme (DL1,DBY747,FL100,D8-25A und PB2-1C) eine im Vergleich zu den anderen (u.a. auch zu 777-3A und KL14-4A) um ca. 50bp verkürzte 300bp-Bande. Da dieses Fragment die GC-Cluster enthält, kann vermutet werden, daß (geschlossen aus der Größen-differenz) eines dieser GC-Cluster in den genannten Stämmen fehlt.

Der Southern-blot mit der mit AluI/EcoRV-geschnittenen mitochondrialen DNA zeigt eine Variation gegenüber KL14-4A bei den Stämmen DL1,DBY746,DBY747,FL100,D8-25A und PB2-1C: das in KL14-4A 625bp lange Fragment ist auf etwa 570bp verkürzt. Dieses ist das

Fragment (Fragment a in Abb.24), das nur noch GC-Cluster 2 und 3 vollständig enthält, während das 1. Cluster mit HpaII zerschnitten wurde.

Auffällig ist, daß in denselben Stämmen beide Fragmente (sowohl das HpaII/EcoRV als auch das HpaII/AluI Fragment) um etwa denselben Betrag verkürzt sind (abgesehen von Stamm 3 im 1. Blot, wo zu wenig mtDNA enthalten war, um darüber eine Aussage machen zu können). Es gibt in den 12 untersuchten Stämmen offenbar lediglich 2 Typen von GC-Cluster Arrangements:

- entweder befinden sich in diesem Bereich 3 GC-Cluster, wovon ausschließlich das erste mit HpaII schneidbar ist (z.B. 777-3A)
- oder es gibt dort nur 2 GC-Cluster, von denen ebenfalls nur das erste eine HpaII Restriktions-Schnittstelle besitzt (z.B. D8-25A). Es kann demnach entweder das 2. oder 3. Cluster fehlen; das erste (mit HpaII schneidbare) Cluster ist nach wie vor enthalten, wie das Ergebnis der Hybridisierung mit HpaII/EcoRV geschnittener mtDNA zeigt.

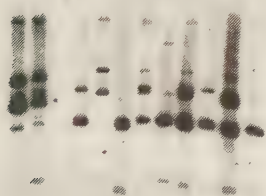
Nicht ausgeschlossen werden kann, daß die in den untersuchten Stämmen vorhandenen Cluster völlig andere sind als diejenigen, die in 777-3A anzutreffen sind. Dies wird jedoch wegen der in den verschiedenen Stämmen anzutreffenden Gleichartigkeit der Fragmentgrößen und Restriktionsmuster als wenig wahrscheinlich angesehen.

HpaII/EcoRV

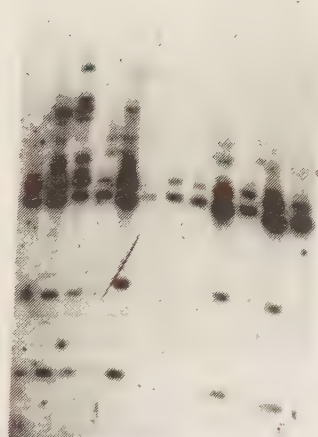
AluI/EcoRV

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



◀ 300 bp
◀ ca. 240 bp



◀ 625 bp
◀ ca. 570 bp

Abb. 25 Hybridisierung von Gesamt-mtDNA, geschnitten mit HpaII/EcoRV bzw. AluI/EcoRV, mit einem den GC-Clustern benachbarten Fragment (siehe Abb. 24). Pfeile markieren die Fragmente, welche GC-Cluster in Intron 3 enthalten. Die Banden im höhermolekularen Bereich sind partiell geschnittene DNA. Folgende Stämme wurden für die Hybridisierung verwendet: 1: DL1; 2: DBY746; 3: DBY747; 4: FL100; 5: FM9a; 6: 777-3A; 7: RM590-9D; 8: D8-25A; 9: KL14-4A; 10: IC8; 11: SM11-6C; 12: PB2-1C.

4.4 Nukleotidsequenz des 2fach-Clusters im Stamm D8-25A

Zur genauen Untersuchung eines Doppelclusters in b13 wurde willkürlich ein Stamm (D8-25A) mit verkürztem HpaII/EcoRV-Fragment herausgegriffen und die Sequenz der GC-Cluster und der Randbereiche bestimmt. Die Strategie der Sequenzierung und die erhaltene Sequenz sind in Abb. 26 und Abb. 27 dargestellt.

Die Nukleotidfolge des GC-Cluster-Bereiches im Stamm D8-25A bildet 2 für GC-Cluster typische "Hairpin"-Strukturen. Die erste davon ist mit der im Stamm 777-3A identisch. Aufgrund der Deletion eines Bereichs aus der 777-3A Sequenz, der sich vom "Loop" des ersten bis zum "Loop" des zweiten Clusters erstreckt, besteht der 2. "Hairpin" in D8-25A aus den zurückbleibenden Hälften des 2. und 3. "Hairpin" aus 777-3A. Abgesehen von der Deletion dieses 65 Basenpaare langen Fragmentes unterscheiden sich die beiden Sequenzen nur durch 3 bp-Austausche (Abb.27).

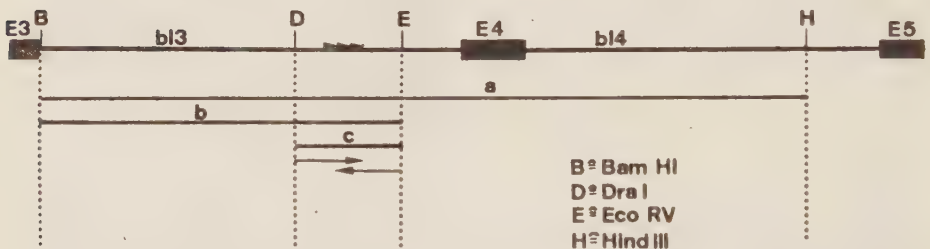


Abb.26 Strategie zur Bestimmung der Nukleotidsequenz der GC-Cluster in bl3 des Stammes D8-25A

Die physische Karte zeigt den Bereich des *gob*-Genes von Exon3 bis Exon5. Die zur Gewinnung der geeigneten Fragmente benutzten Restriktionssites sind eingezeichnet (B = BamHI, D = DraI, E = EcoRV, H = HindIII). Das BamHI-HindIII-Fragment (a) wurde in M13mp18 kloniert. Durch Nachschneiden mit EcoRV wurde Fragment (b) gewonnen. Nach DraI-Restriktion dieses Fragmentes konnte ein für die Sequenzanalyse geeignetes DraI-EcoRV-Fragment (c) isoliert und anschließend in die SmaI-Site des Vektors M13mp18 ligiert werden. Da beide Enden des Fragmentes "blunt" geschnitten sind, war Insertion in beiden Orientierungen möglich. Im sog. C-Test (Messing 1983) konnte ein Vektorpaar identifiziert werden, welches das Fragment in beiden Orientierungen inseriert hatte. Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxymethode (Sanger et al. 1977). Die Pfeile deuten den Bereich an, dessen Nukleotidsequenz bestimmt wurde.

V. Diskussion

1. Sekundärstruktur der Gruppe I-Introns

Bei Beginn der hier vorliegenden Arbeit an bI4 war noch nichts über eine Sekundärstruktur von Introns mitochondrialer oder sonstiger Gene bekannt. Es gab jedoch Hinweise auf wichtige Signale oder Strukturen der Intron RNA mitochondrialer Gene, die für die Excision wichtig sind, nämlich eine Reihe von in trans nicht komplementierbaren Mutationen innerhalb der Introns, die nur als Veränderungen von für das Spleißen wichtigen Elementen erklärt werden konnten. Um die Natur der Signale näher kennenzulernen, wurden, ausgehend von solchen cis-dominanten Mutationen in box9 (ca. 340bp 3' von Exon 4 in bI4) und in box2 (nahe dem 3'Ende von bI4), Revertanten gesucht. Dies geschah im Hinblick auf die Möglichkeit, Interaktionen mit anderen Komponenten nachzuweisen, sofern diese durch kompensatorische Änderungen in der Lage waren die Spleißaktivität wieder herzustellen.

1.1. Kompensatorische Mutationen

Zwei Beispiele für derartige Suppressormutationen wurden gefunden:

(1) Unter den von der box9-Mutante M4751 isolierten Revertanten wurde eine solche charakterisiert, deren atemungskompetenter Phänotyp auf eine Zweitmutation zurückzuführen ist, die, wie genetische und biochemische Analysen zeigten, ca. 300bp 3' von der ursprünglichen Mutation kartiert. Die Analyse der Nukleotidsequenz um die sup⁻-Mutation und die box9⁻-Mutation läßt eine sich über 5 Basen erstreckende Sequenzkomplementarität erkennen. In einem hypothetischen Hybrid zwischen box9 und der komplementären Sequenz (box9c) führt die Primärmutation (box9⁻, G→A) zu einer

Fehlpaarung, wohingegen die "second-site" Mutation in box9c (sup⁻ C→T) die Basenpaarung wiederherstellt. Die Revertante box9⁻ sup⁻ besitzt somit einen, verglichen mit dem Wildtyp, kompensatorischen Basenpaaraustausch (G-C → A-T; vgl. Abb.8, S.45).

(2) Das zweite Beispiel von Mutation und Suppression involviert eine Sequenz nahe dem 3'Ende des Introns (box2) und die box9-Sequenz. Die Untersuchungen an der Mutante G2590 (box2) erbrachten den Nachweis der box2/box9-Paarung in Intron 4 von *ggb*: Die Mutation in box2 stört diese Paarung, die von der Mutante abgeleitete Revertante G2590/RA5 besitzt einen kompensatorischen Basenaustausch in box9 und ermöglicht so wieder perfekte Paarung über eine Strecke von 5 Basen.

Die box9-Sequenz ist somit zweifach hybridbildend: Während der 5'Teil von box9 ein funktionell wichtiges Hybrid mit der weit abwärts gelegenen box2-Sequenz bildet, hat der 3'Bereich von box9 eine komplementäre Sequenz weiter 5' im Intron.

Diese Daten finden Bestätigung in dem von Davies et al.(1982) und Michel et al.(1982) aufgestellten Sekundärstrukturmodell für Gruppe I-Introns: Eine Computeranalyse zeigte, daß hybride Strukturen bei stets gleichbleibendem Grundmuster in den verschiedenen Introns der Gruppe I immer wieder vorkommen; im zentralen Bereich der Sekundärstruktur liegt dabei das E/E' (=box9/box9c)-Hybrid (siehe in Abb.13c das Beispiel bI4). Die Paarung R/S (=box9/box2) ist ebenfalls in allen untersuchten Introns möglich, wurde jedoch in die Modelldarstellung nur teilweise mit aufgenommen.

Die Koinzidenz der experimentellen Befunde mit den durch Computeranalyse erschlossenen Sekundärstrukturmodellen ist überzeu-

gend. Dennoch sollen andere Hypothesen zur Erklärung der Rekstitution der Spleißkompetenz durch die Suppressormutation diskutiert werden.

1. Hypothese: Die Suppression der Mutation in *box9* kommt dadurch zustande, daß die Zweitmutation ein neues Spleißsignal ausbildet, welches das defekte *box9*-Signal substituiert. Ein neues, alternatives Spleißsignal sollte in einer Mutante des *box9*⁺*sup*⁻-Genotyps Spleißen erlauben. Daß dies nicht der Fall ist, wurde in einem Stamm gezeigt, der am Ort der Suppressormutation eine C→T Transition (dies entspricht der Suppressormutation von M4751/R1) und an *box9* Wildtyp-Sequenz besitzt (Haldi, persönl. Mittlg.). Diese Mutante ist atmungsdefekt; sie kann nicht durch Exon-Mutanten in trans komplementiert werden, ist jedoch in der Lage, *box7*-Mutanten zu komplementieren (Lamb et al. 1983). Der cis-dominante Phänotyp der Mutante steht im Widerspruch zur Hypothese eines neuen Spleißsignals; er bestätigt vielmehr, daß die Hybridstruktur zwischen *box9* und *box9c* notwendig ist, da die C→T Transition in *box9c* denselben Phänotyp hat wie die *box9* Mutation.

2. Hypothese: Das im *bI4*-ORF codierte Protein interagiert mit dem *box9*- bzw. *box2*-Signal; die *sup*⁻-Mutation ändert die Sequenz dieses Proteins, welches dadurch die Fähigkeit erwirbt, korrekt mit der mutierten Form des *box9*-Spleißsignals zu interagieren.

In der Tat erzeugen beide Suppressormutationen in dem hypothetischen Protein, welches von den fusionierten Exons B1 bis B4 plus dem *bI4*-ORF translatiert wird (Weiss-Brummer et al. 1982), eine Aminosäuresubstitution:

- in der Revertante M4751/RA5 wird ein Alanin-Codon zu einem

Valin-Codon;

- in der Revertante G2590/RA5 ist in dem hypothetischen Protein ein Threonin gegen ein Isoleucin ausgetauscht.

Es wäre denkbar, daß die veränderten Proteine exakt mit der mutierten box9- bzw. box2-Sequenz interagieren, nicht jedoch mit der des Wildtyps. Daher sollte bei Einkreuzen des Wildtyp-bI4 Produktes die Mutation box9^{sup} in trans komplementierbar sein. Da dieses nicht der Fall ist (Weiss-Brummer et al.1983), muß geschlossen werden, daß der Spleißdefekt, der aus der C→T-Transition resultiert, nicht auf die Aminosäuresequenzänderung in dem von bI4 codierten Produkt zurückzuführen ist. Dieses steht in Einklang mit der Hypothese, daß posttranslationales Schneiden des Exon-Intron-Fusionsproduktes ein C-terminales Fragment vom Molekulargewicht Mr=27kd bildet, das die aktive Maturase darstellt. Die Aminosäureaustausche, welche durch die Suppressormutationen hervorgerufen werden, sind beide nur im Vorläuferprotein, nicht jedoch in der aktiven Maturase vorhanden (Anziano et al.1982, de la Salle et al.1982, Weiss-Brummer et al.1982).

1.2_Das_Sekundärstrukturmodell

Cis-dominante Mutationen in bI4 betreffen nahezu ausschließlich die 20bp der beiden Hybride box9^{3'}/box2 und box9^{3'}/box9c (bzw. R/S und E¹/E nach der Nomenklatur von Davies et al.1982; siehe Abb.13, S.57). Dies spricht für die Rolle der box9-Region, eine Paarung sowohl mit box9c, 5' gelegen, als auch mit box2, 3' gelegen, auszubilden und somit einen Kernbereich der Sekundärstruktur dieses Introns, und sehr wahrscheinlich aller Introns der Gruppe I, darzustellen.

Dieser Kernbereich der Intron-Sekundärstruktur bildet eine Brücke

zwischen den beiden Exons (vgl. Abb.13c) und bringt diese dadurch in relative Nähe zueinander, was für das Spleißen offensichtlich eine wichtige Voraussetzung ist. Es ist verständlich, daß Mutationen in diesen beiden zentralen Hybriden mit größerer Wahrscheinlichkeit die Sekundärstruktur stören, als Mutationen an den mehr am Rand gelegenen Hybriden.

Bemerkenswert ist, daß 7 der insgesamt 12 box9-Mutationen die G/C-Paarung, welche die box9-box9c-Paarung flankiert, betreffen, keine jedoch die 4 anderen Basenpaarungen des Hybrids. Die Reversion zum Wildtyp erfordert die Wiederherstellung dieses G/C-Paares (Tab.I; S.38). Das läßt vermuten, daß diesem G/C-Paar eine wichtige strukturelle Bedeutung zukommt und es daher gegenüber mutativen Veränderungen besonders sensibel reagiert.

Die box9-Sequenz hat zwei Funktionen zu erfüllen: zum einen stellt sie ein Spleißsignal dar, während sie zum anderen zur Expression des in trans wirkenden Produktes von bI4 translatiert werden muß (Weiss-Brummer et al.1982). Die Wiederherstellung beider Funktionen in der Revertante M191/R5 durch eine 2 bp Insertion an der Deletionsstelle ist leicht zu verstehen, da sie den ursprünglichen Leserahmen im bI4-ORF wiederherstellt. Schwieriger zu interpretieren ist die Beobachtung, daß eine 3 bp Insertion an der Deletionsstelle in der Revertante M191/R1, die die Leserasterverschiebung im ORF beibehält, ebenfalls beide Funktionen, wie aus der Atmungskompetenz und dem Wildtypmuster der mitochondrial synthetisierten Polypeptide (Weiss-Brummer et al.1983) abgeleitet werden kann, wiederherstellt. Es scheint, daß das Überlesen des Terminationscodons in Mutante M191 und Revertante M191/R1 komplett unterschiedlich ist, obwohl in beiden

Fällen desselbe TAA Stop-Codon auftritt. Schwaches Überlesen von einigen, aber nicht allen Leseraster-Mutationen wurde bereits für die cis-acting -1 Leseraster Mutante S118 in bI4 diskutiert (Anziano et al.1982). Es mag einen starken Einfluß der umgebenden Sequenz auf die Häufigkeit des Überlesens einer Leserastermutation geben, die in den Fällen der Revertante M191/R1 und der Mutante S118 zu genugenden Mengen an bI4 codiertem Spleiß-Faktor führt. Es existieren für diese Idee jedoch bislang keine experimentellen Hinweise.

Den Abschnitten box2, box9 und box9c homologe Sequenzen werden auch in anderen mitochondrialen Introns von Hefe und *A.nidulans* (Davies et al.1982, Hensgens et al.1983) gefunden, und diese Sequenzen können nach einem ähnlichen Muster wie in bI4 miteinander paaren (Tabelle III). Das läßt die Vermutung zu, daß diese Hybride wie in bI4, so auch in anderen Introns eine Signalfunktion beim Spleißen erfüllen. Zwei Mutationen, die im box9 homologen Bereich von aI4 gefunden wurden (Netter et al.1982), stimmen mit dieser Vermutung überein: sie stören das dem box9^{3'}-box2 homologe Hybrid in aI4.

Tabelle III

Vergleich der zu box9, box9c und box2 homologen Sequenzen in verschiedenen Introns der Gruppe I.

S.c.: *Saccharomyces cerevisiae*. A.n.: *Aspergillus nidulans*. N.c.: *Neurospora crassa*. S.p.: *Schizosaccharomyces pombe*.

bI: *cob*-Gen Intron. aI: *oxi3*-Gen Intron. Positionsangaben sind nach Bonitz et al.1980(S.c.aI3, S.c.aI4); Nobrega und Tzagoloff, 1980(S.c.bI4); Davies et al.1982(A.n.bI); Waring et al.1984(A.n.aI1, A.n.aI2, A.n.aI3); Hensgens et al.1982(S.c.aI5a, S.c.aI5b); Lang 1984(S.p.aI2); Helmer-Citterich et al.1983(N.c.bI1).

¹M4458. ²M191. ³M191/R5. ⁴M191/R1.



A. n. bI	CGUCCU ^{4 2} 1 7 5 UCAGAGACUACAUGCAGGA _{1 9 3} 9 6 8 CUGAU
A. n. aI1	CGCUUC ^{2 8 5} 4 5 3 UCAGAGACUACACGCGAGG _{4 7 3} 5 0 6 CUGAU
A. n. aI2	CGGUUU ^{3 2} 1 2 1 UCAGAGACUUAUACGCCAAA _{1 3 9} 1 0 1 9 CUGAU
A. n. aI3	CGUUGC ^{2 1} 1 3 8 UCAGAGACUUUAUGCAAAC _{1 5 6} 1 0 1 8 CUGAA
S. p. aI2	CGUUGC ^{1 9 8 0} 2 1 3 2 UCAGAGACUUUACGCCAAC _{2 1 5 0} 2 9 5 7 CUGAA
N. c. bI1	GUGAUU ^{2 1 5 0} 2 1 0 8 CUGCAGACUGGGUCACUAA _{2 1 2 6} 2 1 5 8 CUGAC
S. c. aI3	CACAAC ^{4 3 4 1} 4 6 3 0 UCAGAGACUACACGUGUUG _{6 6 4 8} 4 6 8 7 CUGAU
S. c. aI4	CUUUUU ^{7 2 4 5} 7 4 0 2 UCAGAGACUACAAGAAAAA _{7 4 2 0} 8 2 7 0 CUGAU
S. c. aI5a	CGGAGA ^{9 6 9} 1 0 6 6 GUAGAGAUUAGACGCCUCU _{1 0 8 4} 1 1 3 8 CUAAU
S. c. aI5b	CACUUA ^{1 5 2 5} 1 7 9 1 UAGAGACUAAACGUGAAU _{1 8 0 8} 1 8 4 8 CUGAU
S. c. bI2	GUUAUUUAU ^{8 8 5} 9 5 4 CAACAGAAUACACCAAUAAUA _{9 7 4} 1 2 8 7 CUUAA
S. c. bI4	CGUGU ^{8 0 2} 1 0 5 7 UCAGAGACUACACGCACA _{1 1 0 4} 2 1 5 1 CUGAU
S. c. bI4	Mutanten CAU ¹ und C-- ² Revertanten CGC ³ CUAC ⁴

Der kompensatorische Basenpaaraustausch im box2/box9^{5'}-Hybrid von bI4, der durch Mutation und Suppression erhalten wurde, wird auch als natürlich vorkommende bp-Änderung gefunden; Er ist in dem box2/box9^{3'}-Hybrid von Intron 5a des mitochondrialen oxi3-Gens von *Saccharomyces cerevisiae* verwirklicht (Waring and Davies, 1984).

In Kreuzungen zwischen der Revertante sup⁻cob⁻G2590 und dem Wildtyp sup⁺cob⁺ (Abb.10/I,S.49) konnte die Rekombinante sup⁻cob⁺ nicht gefunden werden; alle atmungsdefekten Nachkommen besaßen das G2590-Allel. Da aus solchen Kreuzungen generell beide reziproken Rekombinanten entstehen, muß angenommen werden, daß die sup⁻cob⁺ Rekombinante keinen atmungsdefekten Phanotyp hat und daher nicht entdeckt werden konnte. Diese Rekombinante hatte anstelle des G/C-Basenpaares im Wildtyp ein G/U-Basenpaar im box9^{3'}/box2-Hybrid.

Von einer solchen G/U-Paarung wird angenommen, daß sie weniger als eine G/C-Paarung zur energetischen Stabilität beiträgt; die Paarung ist jedoch offenbar noch hinreichend fest, um der Intron RNA die Faltung, die zur perfekten Excision nötig ist, zu ermöglichen. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, daß in Mitochondrien von *Neurospora crassa* das Wildtyp-Gen "urf 5" in dem der box9^{3'}/box2-Paarung entsprechenden Hybrid eine G/U-Paarung besitzt und das entstehende Transskript gespleißt wird (M.A.Nelson und G.Macino, persönliche Mitteilg.).

Ein kurzer Abschnitt von 3 Basen trennt die beiden Hybride box9^{3'}/box9c und box9^{3'}/box2 (Tab.III,S.100). Die Ergebnisse aus den Studien von Revertanten lassen vermuten, daß diese 3 Basen

eine Spacerfunktion erfüllen. In der ersten der 3 Positionen überwiegt C. Die mittlere Position zeigt stets ein A, außer in einer Revertante einer bI4 Mutante; das mag auf die Notwendigkeit einer Purinbase an dieser Position hindeuten. Die Insertion eines U zwischen der 2. und 3. Base, die den hypothetischen Spacer auf 4 Basen verlängert, wird akzeptiert. Die minimale Länge des Spacers scheint 3 Basen zu sein, da die Deletion von 2 Basen in der Mutante M191 (Position 1098 und 1099) einen Spleißdefekt verursacht und Reversion nur durch Wiedereinfügen von 2 Basen (in 7 Revertanten bekannt) oder 3 Basen (2 Revertanten bekannt) erreicht wird. Die Notwendigkeit einer minimalen Spacerlänge hat möglicherweise die gleichzeitige Existenz der beiden Hybride box9^{3'}/box2 und box9^{3'}/box9c als Ursache. Aus stereochemischen Gründen oder aufgrund der potentiellen Wechselwirkung mit Proteinen mag es erforderlich sein, die beiden Hybride durch wenige Basen voneinander zu trennen.

Neben den beiden zentralen Hybriden E/E' und R/S konnte in bI4 lediglich eine weitere Paarung durch Mutation und Suppression experimentell bestätigt werden:

Kürzlich wurde von Perea et al. (1985) zur Mutante G2457, die den 5'-proximalen "Hairpin" (Abb13c) durch eine G→A-Transition 2bp vor Exon-Ende stört, eine Revertante beschrieben, die an genau der gegenüberliegenden Position im "Hairpin" kartiert und die Paarung wieder perfekt herstellt.

Abgesehen von der hohen Konservierung der Sekundärstruktur in sämtlichen Introns der Gruppe I gibt es, neben der Analyse von Revertanten in bI4, noch eine Reihe weiterer Indizien, die für die Richtigkeit des Sekundärstruktur-Modells sprechen:

(1) die konservierten Abschnitte zeigen stets, falls deren Sequenz von der Konsensus-Sequenz abweicht, kompensatorische Änderungen, so daß Basenpaarung in jedem Fall möglich ist; dies spricht eindeutig für die Bedeutung der paarenden Bereiche.

(2) an dem relativ kleinen Intron der rRNA von Tetrahymena, das einen typischen Vertreter der Gruppe I darstellt, wurde eine Reihe von experimentellen Untersuchungen zur Aufklärung der Sekundärstruktur durchgeführt:

- lineare Intron-RNA wurde unter nicht denaturierenden Bedingungen mit verschiedenen einzel- und doppelstrangspezifischen Nukleasen verdaut und deren Schnittstellen kartiert (Cech et al.1983).
- Die in vitro herausgeschnittene, cyclisierte RNA wurde unter nicht denaturierenden Bedingungen mit Agenzien behandelt, die spezifisch nur solche Basen modifizieren, die nicht in Paarungen involviert sind (Inoue et al.1985).
- ein in M13mp83 ligiertes DNA-Fragment, das die Intronsequenz des Wildtyps und nach in vitro Mutagenese gezieht veränderte Intronsequenzen plus flankierende Exons enthält, wurde nach Transformation in E.coli auf "Self-splicing"-Aktivität geprüft: die Wildtypsequenz war auch in der E.coli-Zelle zum "Self-splicing" fähig, etliche Mutanten, darunter erstmals solche im paarenden Bereich des P/Q-Hybrids, verhindern das Spleißen (Waring et al.1985).

Alle drei genannten Untersuchungsansätze führten zu Ergebnissen, die in völliger Übereinstimmung mit dem von Michel et al.(1982) vorgeschlagenen Sekundärstrukturmodell der Gruppe I-Introns sind.

(3) Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung paarender und konser-

vierter Bereiche in den Gruppe I-Introns, der allerdings mit der nötigen Vorsicht betrachtet werden muß, wurde in Michel (1984) erwähnt: Die wenigen seltenen Codons (das sind solche, die an der 3. Position G oder C besitzen, auch wenn nach der Codetabelle A oder T zu derselben Aminosäure führen würde), die in den offenen Leserahmen der Introns gefunden werden, sind in einer Reihe mitochondrialer Introns und z.B. im RF2 (Michel 1984) in Hefe mit Sekundärstrukturen assoziiert. Diese Beteiligung an wichtigen Elementen der Sekundärstruktur kann besonders eindrucksvoll am Intron 3 von *ggb* demonstriert werden.

Bei Intron 3 läßt sich ohne Schwierigkeiten eine Sekundärstruktur bilden, wie sie für Gruppe I-Introns charakteristisch ist; die Bereiche P/Q und R/S sind sehr ähnlich der Konsensus-Sequenz (Konservierung für P/Q:90/80% und für R/S:83/100%).

Die einzige Abweichung von den in Waring (1984) untersuchten Introns betrifft den Bereich zwischen E' und R: meist sind diese Bereiche durch einen Spacer von 3 Basen getrennt; in einer Untergruppe befindet sich dort ein "Hairpin-loop", der in sämtlichen Introns dieser Untergruppe auch auf Primärsequenzniveau Ähnlichkeit aufweist. Diese Untergruppe zeichnet sich auch durch geringfügige Abweichungen in Details der Sekundärstruktur aus, die allen Mitgliedern gemeinsam sind. Obwohl in bI3 zwei "Hairpin-Loop"-Strukturen zwischen E' und R inseriert sind, gehört bI3 der genannten Untergruppe nicht an: weder haben die "Hairpin"-Strukturen irgendwelche Gemeinsamkeiten der Sequenz, noch finden sich in bI3 die übrigen charakteristischen Abweichungen der Struktur.

Sehr suggestiv ist die Verteilung der seltenen Codons innerhalb

der Sekundärstruktur: diese sind vor allem in dem kurzen Bereich vor der LAGLI-DADG Region lokalisiert, in dem Bereich, der die Sekundärstruktur aufbaut. Dieser Teil macht 27% des gesamten offenen Leserahmens im Intron aus, besitzt jedoch 7 von insgesamt 9 seltenen Codons. In dem für die aktive Maturase codierenden Bereich (vermutet in Analogie zu bI4 und bI2) sind sie äußerst selten anzutreffen. Bei genauer Analyse der Sekundärstruktur zeigt sich, daß fast bei allen seltenen Codons das Vorhandensein eines G oder C an der 3. Position dadurch erklärt werden kann, daß diese Base in der RNA entweder in eine intramolekulare Paarung involviert ist oder Bestandteil eines hoch konservierten Bereichs ist, also daß stringente Bedingungen der Sekundärstruktur diktieren, daß G oder C die 3. Position an den entsprechenden Stellen einnehmen (siehe Abb.22,S.78).

Erstaunlicherweise findet sich eine ähnliche Clusterung von seltenen Codons auch in bI2. Von insgesamt 12 seltenen Codons im offenen Leserahmen (840bp lang) sind 7 im Bereich vor dem ersten konservierten Dekapeptid lokalisiert (einer ca. 240bp langen Region), und dies obwohl die typische Sekundärstruktur in bI2 nicht von dieser Region gebildet wird (siehe Abschnitt 2). Lediglich die ersten beiden dieser seltenen Codons sind in eine konservierten "Hairpin"-Struktur involviert (Abb.17,S.66): Das erste C verhindert eine Basenpaarung an der Position direkt benachbart der Schnittstelle zwischen Exon und Intron. Diese Nichtpaarung mag für bI2, das keine IGS (internal guide sequence, siehe S.107) ausbildet, eine besondere Bedeutung haben. Das zweite C, das an der 3. Position eines Ala-Codons steht, ist in eine Paarung involviert (Abb.17,S.66). Wenn von diesen beiden seltenen Codons

abgesehen wird, ist deren Anhäufung vor LAGLI-DADG jedoch statistisch nicht signifikant und mag zufällig bedingt sein.

2. Mögliche Hybride im cob-Intron 2

Die bisher erwähnten cis-acting Mutationen befinden sich ausschließlich in den Introns bI4 und aI4. Diese beiden Introns sind, wie Sequenzvergleiche zeigen, sehr homolog (80% innerhalb der LAGLI-DADG-Region, 37% 5' und 47% 3' davon (Hensgens et al.1983). Ihre enge Verwandtschaft wird noch dadurch unterstrichen, daß erstens diesselbe Maturase, nämlich die in bI4 codierte, an der Excision beider Introns beteiligt ist und zweitens, daß eine Suppressormutationen, die eine trans-rezessive (also die Maturase zerstörende) Mutation in bI4 kompensiert, in aI4 lokalisiert ist und vermutlich dort die Maturase so verändert, daß sie die Funktion des in bI4 codierten Proteins übernehmen kann (Dujardin et al.1982).

Zur Beantwortung der Frage nach der Bedeutung der als zentral betrachteten Struktur E/E'-R/S sind cis-acting Mutationen in zwei weiteren Introns analysiert worden: 3 Mutationen in bI2 und 4 Mutationen in bI3. In bI2 kartieren die Veränderungen zweier Doppelmutanten: da beide (G5046 und M561) nicht revertieren, kann geschlossen werden, daß jeweils jede einzelne der bp-Änderungen in den Mutanten bereits Spleißdefizienz bewirkt. Da keine der Mutationen im offenen Leserahmen von bI2 lokalisiert ist, darf angenommen werden, daß auch keine davon in trans komplementierbar wäre. Somit existieren in bI2 5 cis-acting Mutationen, die unterschiedliche Bereiche der bI2-RNA verändern und dadurch

die Intronexcision vereiteln.

Von *cob*-Intron 2 war bislang kein Sekundärstrukturmodell aufgestellt worden. Die Schwierigkeit beim Aufbau eines solchen bestand im Auffinden der typischen konservierten Bereiche der Gruppe I Introns, da diese im Gegensatz zu den bisher untersuchten Introns dieser Gruppe in bI2 alle mehr oder weniger stark abgewandelt sind. Die vergleichende Analyse weiterer konservierter Merkmale (siehe Seite 65), die den Introns der Gruppe I zu eigen sind, führten dann auch in bI2 zum Erfolg.

In den meisten Introns der Gruppe I bringt die Sekundärstruktur über die Paarungen E/E' und R/S das 5' und 3' Ende der Introns in räumliche Nähe. Eine sog. "Internal guide sequence" (siehe z.B. Abb.22b für bI3) führt dann Ende und Anfang der flankierenden Exons bis auf die Distanz einer Phosphodiesterbindung zusammen.

Von 19 untersuchten Introns (Waring and Davies 1984) weicht eine Gruppe von 5 Introns hinsichtlich zweier Kriterien von allen anderen ab: Intron 1 im *oxi3*-Gen von *A.nidulans* und Intron 3 im *oxi3*-Gen von *S.cerevisiae* (erwähnt in Davies et al.1982), das Intron im *rRNA*-Gen von *P.polycephalum* (Waring et al.1983), Intron 2 im *cob*-Gen von *N.crassa* und Intron 5 im *cob*-Gen von *S.cerevisiae*. In den genannten 5 Introns ist die 5'-Spleißstelle von der Sequenz "E" durch eine lange Distanz getrennt. Diese Introns benutzen außerdem vermutlich von den übrigen abweichende "Alignement"-Strukturen; die sonst anzutreffende IGS läßt sich nicht ausbilden.

Beide genannten Kriterien dieser Untergruppe treffen auch auf bI2 zu: zwischen dem 5'-Spleißpunkt und "E", der ersten konservierten

Sequenz der "core"-Struktur liegen 884bp; eine IGS läßt sich nicht bilden. Die Sekundärstruktur wird also ausschließlich von 3'-Teil des Introns aufgebaut, dort wo kein offener Leserahmen zu finden ist. In den allermeisten Introns der Gruppe I ist der Hauptteil der Sekundärstruktur im 5'-Teil des Introns lokalisiert, noch in dem Bereich, der aus dem Vorläufer-Protein herausgeschnitten wird; dieser Hauptteil wird über eine Paarung zwischen E/E' und R/S und über die R/S Paarung selbst (siehe Abb.22a als Beispiel) mit dem 3'-Teil des Introns verbunden. In bI2 (wie in den anderen 5 Introns dieser Untergruppe) existiert keine offensichtliche Verknüpfung zwischen dem 5'- und 3'-Teil; es ist nicht ersichtlich, wie durch den Aufbau der Sekundärstruktur die beiden Exonenden zueinander gebracht werden können.

Auch wenn die Sekundärstruktur keine befriedigende Erklärung zu geben vermag, wie die Exonenden sich räumlich nahe kommen, so muß doch aufgrund der Tatsache, daß die wichtigsten Kriterien, welche die Introns der Gruppe I charakterisieren, auch in bI2 vorhanden sind, und selbst die Abweichungen in so charakteristischer Weise anzutreffen sind, daß sie eine eigene Untergruppe definieren, angenommen werden, daß die in Abb.17 gezeigte Struktur das richtige Modell darstellt.

Die Struktur E/E'-R/S, die z.B. in bI4 eine zentrale Stellung einnimmt, da sie die 5'- und 3'-Enden des Introns zusammenhält, sollte in bI2, wo dies nicht der Fall ist, eine geringere Bedeutung haben. Dies bestätigt sich darin, daß keine einzige der sequenzierten cis-acting Mutationen die Ausbildung der genannten Hybride stört. Die Mutationen befinden sich vielmehr verstreut in bisher nicht als wesentlich betrachteten Elementen der Sekundär-

struktur (siehe Abb.17):

- in der Mutation M561(a) (-1C) ist das Hybrid benachbart von P/Q betroffen
- in M561(b) ist eine Base benachbart der Region S verändert
- die Mutation in P366 verändert eine Base in einer ungepaarten Region zwischen E' und S. Die veränderte Base liegt weder in einem konserviertem Bereich noch ist sie an einer Paarung beteiligt (eine zu der betroffenen Sequenz komplementäre wurde in bI2 nicht gefunden).

Das Phänomen, daß sich Mutationen in Regionen befinden, die weder konserviert noch gepaart sind, muß nicht notwendigerweise das Sekundärstruktur-Modell in Frage stellen: auch nicht konservierte Elemente (Regionen) mögen wichtig sein für genau dieses Intron, entweder im Kontext der gesamten räumlichen (Tertiär-) Struktur oder gefordert von den für bI2 spezifischen Spleißenzymen (z.B. Maturasen).

- Die Mutation G5046(a) liegt am Fuße einer "stem-loop"-Struktur eng benachbart der E/E'-Paarung; der Austausch G→A macht die Paarung stabiler; dies mag unvorteilhafte sterische Konsequenzen haben.
- Die zweite Mutation von G5046 betrifft die erste Base des Spacers zwischen E/E' und R/S: diese ist relativ stark konserviert; sehr häufig befindet sich dort (wie in bI2) ein C; dieses wird in G5046 durch ein A ersetzt.

Wir befinden uns bei der Analyse der bI2-Struktur in derselben Phase, wie sie bei bI4 vor Kenntnis der box9- und box2-Suppressormutationen bestand: Mutationen in verschiedenen Bereichen sind bekannt, über die betroffene Funktion dieser Bereiche kann allen-

falls spekuliert, jedoch keine gesicherte Aussage gemacht werden; die Situation ist in bI2 relativ ungünstig, da sich 4 mutative Veränderungen in 2 Doppelmutanten vereinen, die nicht (bzw. äußerst selten) revertieren.

3. Identifizierung einer nicht-hybriden Sequenz als Teil eines Spleiß-Signals

Eine erfolgversprechendere Ausgangsposition in dieser Hinsicht besteht bei den Mutanten im *gqb* Intron 3. Beide Mutantentypen (+A, -A) liegen geclustert in einem (selbst in bI2) hoch konservierten Abschnitt von Q (Abb.22a, S.78 und Abb.28). Die Mutationen liegen in einem "Loop", stören also keine für die Bildung der Sekundärstruktur notwendige Paarung. Dies ist das erste Beispiel für eine Mutation in einem, dem Haupttyp (S.107) zugehörigen, Gruppe I-Intron, dessen Effekt nicht auf die Destabilisierung eines intramolekularen Hybrids zurückgeführt werden kann. Der mutierte Bereich mag eine Erkennungsstelle für ein am Spleißvorgang beteiligtes Enzym verändern und dadurch die Intronexcision verhindern.

Es sei an dieser Stelle auf Parallelen mit der cis-dominanten Mutante M1301, die in bI1 lokalisiert ist, hingewiesen, welche die genannte Vermutung über die Art des betroffenen Spleißsignals unterstützen:

diese Mutation liegt in einem ganz ähnlich wie in bI3 strukturierten Bereich (Loop, Serie von A) und hat die gleiche Veränderung wie ein Mutantentyp in bI3(-1A). Zu dieser bI1-Mutante wurden bereits Kernsuppressoren charakterisiert; ein Suppressor-gen wurde kloniert und sequenziert; die Identifizierung eines

längeren offenen Leserahmens auf dem zur Komplementation von M1301 fähigen Restriktionsfragment läßt vermuten, daß die Suppression durch ein abgewandeltes Protein bewirkt wird, welches die mutative Änderung in der RNA-Struktur zu kompensieren in der Lage ist (C.Schmidt, personl. Mittlg.).

Abb.28 Dargestellt ist das P/Q-Hybrid und Randsequenzen als Konsensus-Sequenz mit den häufigsten Basen und der Häufigkeit des Vorkommens in 22 Introns. Die untersuchten Introns sind aus Nobrega et al.1980, Bonitz et al.1980, Waring et al.1984, Netzker et al.1982, Cech et al.1983, Burke et al.1982, Citterich et al.1983. Der in den sequenzierten box10 Mutanten veränderte Bereich ist durch *** markiert.



Aus den Mutanten in b13 entstehen nur 2 Typen von Revertanten: solche, die genetisch nicht vom Wildtyp unterscheidbar sind (es wurde nicht geprüft, ob sich darunter Introndeletionen befinden) und wenige andere (<1%) mit einer Suppressormutation im Kern. "Second site"-Suppressoren innerhalb desselben Introns, die Aufschluß über Wechselwirkungen innerhalb der Intron-RNA geben könnten, wurden nicht gefunden.

4. Proteine und RNA-Spleißen

Wie bereits in den Ergebnissen dargestellt, weist das Intron 3 in *cob* über den gesamten offenen Leserahmen und den 3' Teil des Introns auf Nukleotidsequenzniveau eine ungewöhnlich hohe Homolo-

gie zum einzigen Intron in *cgb* bei *Aspergillus nidulans* auf. Andere Paare von Introns mit außergewöhnlich hoher Sequenzhomologie sind *bi4* und *ai4* in Hefe, *cqx* Intron 2 in *Schizosaccharomyces pombe* und das *cqx*-Intron 3 von *A.n.d.*. Es wird spekuliert, daß solche Paare homologer Introns aus einem gemeinsamen Vorfahren durch nicht sehr lange zurückliegende Sequenztransferereignisse innerhalb desselben oder zwischen verschiedenen Spezies, entstanden sind (Lazowska et al.1981, Netter et al.1982, Lang 1984).

Im Fall des *cgb*-Introns von Hefe und *Aspergillus* ist es bemerkenswert, daß für zwei funktionell voneinander völlig unabhängige Sequenzen, nämlich die offenen Leserahmen, die für die hypothetischen Maturasen codieren und die 5'- und 3'-Enden der Introns, die am Aufbau der RNA-Sekundärstruktur beteiligt sind, eine sehr hohe Homologie besteht. Dies läßt sich am besten durch die Annahme erklären, daß für beide Introns ein gemeinsamer Vorfahre existiert hat, der bereits beide Elemente, nämlich den die Sekundärstruktur aufbauenden und den die Maturase codierenden Bereich, im Intron enthalten hatte. Eine gemeinsame konvergente Evolution zweier nicht verwandter Sequenzelemente erscheint relativ unwahrscheinlich.

Es sind Beispiele bekannt, wo zwischen 2 Introns nur eines der beiden Elemente hoch konserviert ist oder in einem Paar sehr homologer Introns nur eines von beiden einen für ein Protein codierenden, offenen Leserahmen besitzt.

Ersteres ist beim Vergleich von *ai4* und *bi4* festzustellen: während die Sequenzen innerhalb der beiden Dekapeptide und der codierende Teil 3' davon zu 80% bzw. 47% homolog sind, zeigt der 5' davon liegende Bereich mit 37% eine deutlich geringere Ver-

wandschaft, und die geschlossenen Leserahmen im 3'-Teil lassen keinerlei Homologie erkennen. Ähnlich wie beim Vergleich von bI3 in Hefe und bI in *A.nidulans* feststellbar, haben die Bereiche vor dem ersten Dekapeptid durch Insertions-/Deletionsereignisse keinerlei Homologie auf Aminosäuresequenzniveau. Eine vergleichbare Situation wie im Beispiel bI4/aI4 existiert zwischen dem Intron bI2 und dem der großen ribosomalen RNA in Hefe Mitochondrien.

Für die geringere Homologie der äußeren Bereiche sind zwei Ursachen denkbar:

(1) In dem hypothetischen Vorläufer-Intron waren sowohl die äußeren als auch der mittlere Teil enthalten; wenn nun am codierenden Bereich stärkerer Selektionsdruck auf Erhaltung der Sequenz bestand, wurden dort sehr viel weniger Basenpaar-Änderungen toleriert als in den äußeren Bereichen, an die möglicherweise weniger stringente Anforderungen gestellt wurden.

(2) Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist, daß im Vorläufer-Intron der für die Maturase codierende Bereich nicht enthalten war; dieser inserierte in zwei unabhängigen Ereignissen erst lange Zeit nach der Duplikation des Introns.

Dafür, daß dieser Bereich, der für die aktive Maturase codiert, eine gewisse Beweglichkeit besitzt, spricht auch der Vergleich folgender Introns:

- AI2a (ein Intron des *cox1* Genes von *S.pombe*)
mit bI4 (K. Wolf, persönl. Mittlg.)
- Intron in der rRNA von *Tetrahymena* (Michel et al. 1985)
mit dem Intron 1 im URF 1 von *P.anserina*

Das jeweils erstgenannte Intron ist sehr kurz und besitzt keinen offenen Leserahmen, das jeweils letztere beinhaltet dagegen einen

langeren Bereich, der für ein Protein, eine Maturase bei bI4 und ein damit nicht verwandtes Protein mit unbekannter Funktion in Intron 1 des URF1 codiert. Beide können als Insertion gedeutet werden. Wenn von dieser Insertion abgesehen wird, zeigen die Introns jeweils paarweise eine sehr hohe Homologie, die auf eine enge verwandtschaftliche Beziehung hindeutet. Daher liegt die Vermutung nahe, daß die Introns in ihrer ursprünglichen Form nicht beide Teile (den die Sekundärstruktur bildenden und den für die Maturase codierenden) besessen haben, sondern daß nach Duplikation des Introns nur in eines von beiden ein ORF inseriert ist.

Die nicht in Introns enthaltenen URFs beginnen unmittelbar mit der LAGLI-DADG Region; man kann ihr unabhängiges Auftreten ebenfalls als Hinweis auf die Eigenständigkeit dieser Region werten. In vielen Fällen ist es zu einer wechselseitigen Anpassung und Abhängigkeit zwischen dem im ORF codierten Protein und dem Intron gekommen, nämlich im Fall der sog. Maturasen, die für Intronexcision in vivo benötigt werden. Nicht immer jedoch hat sich eine solche Abhängigkeit des Introns von dem in ihm codierten Protein herausgebildet: das Intron der großen ribosomalen RNA in Hefe Mitochondrien wird auch im rho⁻-Genom excisiert, ein Beweis dafür, daß Translation und damit die Expression des offenen Leserahmens zur Excision nicht nötig ist. Wie bereits erwähnt zeigt die LAGLI-DADG Region des rRNA-Introns eine signifikante Homologie (29%) zu dem entsprechenden Bereich in bI2, welcher mit Sicherheit für eine Maturase codiert. Der *gcf* im rRNA-Gen besitzt ebenfalls gut ausgeprägt die allen bekannten Maturasen gemeinsamen, konservierten Dekapeptide.

Kürzlich wurde in 2 unabhängigen Arbeiten (Jacquier et al. 1985,

Macreadie et al.1985) über die Funktion des im rRNA-Intron codierten Proteins berichtet: es schneidet versetzt an einer hochspezifischen "target-site" im (intronlosen) rRNA-Gen und leitet damit den Prozeß der Genkonversion ein. Das mit Maturasen verwandte Protein hat also enzymatische Aktivität am DNA-Molekül. Ein Hinweis auf eine ganz anders geartete enzymatische Aktivität von "Maturase"-Proteinen brachten die Untersuchungen von Michel und Lang (1985): die offenen Leserahmen von aI1 und aI2 zeigen signifikant homologe Bereiche mit reversen Transskriptasen; besonders auffällig ist die Homologie in den für die enzymatische Aktivität als verantwortlich erachteten Domänen.

Es scheint also introncodierten Proteinen, die für das Spleißen notwendig sind, eine Verwandtschaft zu enzymatisch aktiven Proteinen zuzukommen, scheinbar im Gegensatz zu der oft geäußerten Ansicht, daß es sich bei ihnen möglicherweise um die RNA-Struktur festigende und stabilisierende Proteine handeln sollte.

Selbst bei den Proteinen, die die konservierten Dekapeptide besitzen, ist der Wirkungsort nicht, wie aufgrund der Aktivität als Maturaseprotein vermutet werden konnte, ausschließlich auf RNA beschränkt, sondern, wie sehr deutlich am Beispiel des im rRNA Intron codierten Proteins zu erkennen ist, auch an doppelsträngiger DNA. Die Spekulation, daß die bekannten Maturaseproteine ebenfalls noch eine ähnlich geartete Funktion besitzen mögen, wird unterstützt durch die Beobachtungen am Reversionsverhalten von zwei bI2-Mutanten: beide sind Doppelmutanten, von denen jeweils beide Mutationen im offenen Leserahmen des Introns lokalisiert sind. Mutante G55, die 2 Ochre-(Stop-)Mutationen besitzt, revertiert ausschließlich durch Introndeletion, während M190i, in

deren offenem Leserahmen 2 missense-Mutationen liegen, überhaupt nicht revertiert. Dies wurde dadurch erklärt, daß die Akkumulation von großen Mengen strukturell modifizierter mRNA-Maturase in G1901 das "DNA-Spleißen" verhindert, während ihr völliges Fehlen in G55 keinen störenden Effekt hat, da dessen Funktion evtl. von einem anderen Protein übernommen werden kann (Gargouri et al. 1983).

Die Maturase ist demnach offenbar in den Prozess der Intronexcision auf DNA-Ebene involviert und interagiert dabei evtl. mit doppelsträngiger DNA.

(Als alternative Erklärung könnte man sich vorstellen, daß die veränderte Maturase in G1901 durch Interaktion mit dem bI1 Anteil der Vorläufer-mRNA verhindert, daß auch geringste Mengen an bI1 excisiert werden, während in G55 durch geringe "Self-splicing"-Aktivität (die in den Mutanten M561 und G5046 wegen der gestörten Sekundärstruktur nicht möglich ist) z.T. reife mRNA entsteht, die über ein rekombinatives Ereignis (sei es, daß die RNA direkt mit der genomischen DNA interagiert oder erst nach Umschreibung in DNA) zur Introndeletion führt).

An der Aufgabe, die Sekundärstruktur der Intron-DNA zu stabilisieren sind sehr wahrscheinlich Proteine des Kernes beteiligt: darauf deuten die beiden bisher bekannten cis-acting Mutanten, zu denen Kern-codierte Suppressoren gefunden wurden, hin: sup101 kompensiert eine Mutation in bI1, sup301 (in M811/RG1, S.81) eine in einem ähnlich aufgebauten Abschnitt der Sekundärstruktur gelegene Mutation in bI3. Beide Mutationen liegen weit im Innern des Introns - sie betreffen möglicherweise eine tertiäre Interaktion im RNA-Molekül; diese Störung mag das veränderte Protein in den

Revertanten im RNA-Protein-Komplex kompensatorisch wieder aufheben.

Abgesehen von den beiden genannten Suppressoren sind bislang lediglich 2 weitere Kernfaktoren bekannt, die an der Excision nur eines bestimmten Introns beteiligt sind:

CBP2 wird benötigt für die Excision von bI5
MIP1 wird benötigt für die Excision von bI3

Von letzterem Protein wurde das entsprechende Gen in einem Klon identifiziert, der in der Lage ist, die Mutante MK3 (defekt in der bI3-Excision) zu komplementieren. Zerstörung des Wildtyp-Gens MIP1 führt zum selben Phänotyp wie bei MK3, was bestätigt, daß die einzige Funktion des Proteins die Beteiligung an der bI3-Excision zu sein scheint. Denkbar wäre, daß in MK3 und in M811/RG1 dasselbe Gen betroffen ist. Dies zu überprüfen bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Die Suppression von M811 durch ein Kernprotein ist insofern nicht ganz leicht zu erklären, als die Mutation nicht nur die Sekundärstruktur der RNA verändert (dies wurde nachgewiesen im Komplementationstest), sondern zusätzlich einen Rasterschub im ORF von bI3 verursacht. Möglicherweise besteht jedoch keine Notwendigkeit, letzteren Defekt zu supprimieren, da ein schwaches Überlesen der "frameshift"-Mutation, ähnlich wie bei Exon-Mutanten in E1 von cgb (Weiss-Brummer et al. 1984) es erlaubt, die geringen Mengen an Maturase, die zum Spleißen nötig sind, zu synthetisieren.

5. GC-Cluster in Intron 3

Der Vergleich von bI3 in *S.cerevisiae* und dem einzigen *gcb*-Intron von *A.nidulans* läßt eine relativ starke Homologie auf Nukleotidsequenzniveau erkennen (durchschnittlich ca. 65%). Um diesen hohen Grad an Homologie zwischen den beiden Introns zu erreichen, ist es erforderlich von einigen Sequenzabschnitten, die im einen oder anderen Intron zusätzlich vorhanden sind, abzusehen. Diese zusätzlichen Sequenzen verändern nicht die typische Sekundärstruktur der beiden Gruppe I-Introns, sondern befinden sich vielmehr in Bereichen, die als akzessorische Elemente der Sekundärstruktur betrachtet werden (Abb.21 und 22a, S.75 u.78).

Die zusätzlichen Sequenzen besitzen meist eine "Hairpin"-Struktur. Ob diese Sequenzabschnitte, die im jeweils anderen Intron keine Entsprechung finden, als Insertionen oder Deletionen gedeutet werden sollen, ist unklar. Sie scheinen jedoch eine gewisse Beweglichkeit zu besitzen und mögen in dieser Beziehung mit den sog. GC-Clustern, deren Mobilität außer Zweifel steht, verwandt sein.

Weit über 100 dieser GC-Cluster wurden bislang auf dem mitochondrialen Genom von *S. cerevisiae* lokalisiert. Die meisten davon sind als Einzelcluster in AT-reiche intergenische Regionen, seltener innerhalb von Genen inseriert. Etwa 20% der Cluster treten als Multimere, meist Di- oder Trimere auf. Die einzelnen Elemente sind dann im allgemeinen direkt hintereinandergeschaltet ohne irgendwelche Spacersequenzen dazwischen oder, wie in bI3, es fehlen gar die 3 ersten Basen der universell auftretenden Anfangssequenz der Cluster. (Es wurde bereits erwähnt, daß dieses Triplet jedoch weniger dem GC-Cluster, als vielmehr dem ursprüng-

lichen mitochondrialen Genom zuzuordnen ist).

Bisher sind solche Mehrfach-Cluster nicht in unterschiedlichen Stämmen vergleichend untersucht worden, was Hinweise auf die Entstehung dieser Strukturen hätte geben können. Es ist vorstellbar, daß die "target-site", die bei Integration eines GC-Clusters am Beginn desselben erhalten bleibt, erneut als Ziel-Sequenz erkannt wird. Das ist nicht ohne weiteres selbstverständlich, da nicht ausgeschlossen werden kann, daß die Sequenzen beiderseits von TAG für die Erkennung eine wichtige Rolle spielen. Vorstellbar wäre die Notwendigkeit AT-reicher Sequenzen beiderseits der Zielsequenz, wie sie bei allen GC-Clustern zu beobachten ist. Erneute Erkennung eines TAG am 5'-Rand eines bereits inserierten Clusters würde bedeuten, daß zumindest der Bereich 3' davon diese Anforderung nicht erfüllen muß.

Eine weitere interessante Frage ist, ob die GC-Cluster von solchen Aggregaten einzeln in der Lage sind, den Ort zu wechseln (einzeln optional sind) oder ob die Cluster nur gemeinsam (als Aggregat) auftreten können.

Diese Fragen zu beantworten wurde nach Variationen des Dreifach-clusters in bI3 gesucht. Die nach Auswertung des Southern-Experimentes naheliegende Vermutung, daß in einigen Stämmen nur noch 2 der 3 GC-Cluster vorhanden sind, hat die Sequenzierung des entsprechenden Bereiches bestätigt.

Die Darstellung des GC-Cluster-Triplets in 777-3A (Abb.23) suggeriert das Vorhandensein von 3 Clustern, die alle in derselben Orientierung inseriert sind und dessen beiden letzten Clustern die jeweils am Anfang konservierte Sequenz TAG fehlt. Der Vergleich mit der entsprechenden Region im Stamm D8-25A läßt

jedoch noch eine andere Sichtweise zu: im ursprünglicheren Zustand (wie er noch im Stamm D8-25A vorliegt) waren in bI3 2 GC-Cluster inseriert. Diese entsprechen im Stamm 777-3A dem ersten, der ersten Hälfte des zweiten und der letzten Hälfte des 3. GC-Clusters (die beiden letzten GC-Cluster besitzen sehr ähnliche Nukleotidsequenzen und daher sind die jeweils ersten und zweiten Teile zueinander komplementär). Im "Loop" dieses 2. Cluster im Stamm D8-25A tritt die Sequenz CTA auf (im Gegenstrang TAG), also das Triplet, welches als typische "target-site" für die Insertion von GC-Clustern angesehen wird. Genau in einem dieser CTA (Abb.29) ist die zusätzliche Sequenz, die selbst wieder die für GC-Cluster typische "Hairpin-Struktur" bildet, inseriert. Die Integration des Clusters läßt sich genau so erklären, wie bisher angenommen wurde: versetzter Schnitt am CTA, Insertion des Clusters und Verdoppelung des CT:



Zusätzlich sind 5' von dem inserierten Bereich 7bp verdoppelt. Ob diese Duplikation gleichzeitig mit oder unabhängig von dem Insertionsereignis des zusätzlichen GC-Clusters stattgefunden hat, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Die Tatsache jedoch, daß die duplizierten Bereiche beide 5' der inserierten Sequenz liegen, läßt eher letzteres vermuten.

Die Beobachtung, daß sich eine sehr ähnliche Sequenz in anderen Mehrfachclustern ebenfalls z.T. mehrfach direkt nebeneinander auftritt (Faugeron-Fonty and Goyon,1985), kann als Hinweis gewer-

tet werden, daß der Verdoppelung dieser Abschnitts ein spezifischer Mechanismus zugrunde liegt.

Links und rechts von der Insertionsstelle ist jeweils die 3. Base verändert. Ob diese Basenpaar-Austausche im Zusammenhang mit der Insertion eines GC-Clusters stehen oder ob die Integration in eine mutativ veränderte Sequenz erfolgte, läßt sich derzeit nicht sagen.

Die entstehende Struktur nach Insertion zeigt Abb.29. Diese ist isomer mit der Darstellung in Abb.23, S.83).

Welche Vorgänge genau ablaufen, läßt sich erst beantworten, wenn vergleichende Analysen von anderen Mehrfachclustern, deren Größe in verschiedenen Stämmen unterschiedlich ist, Gemeinsamkeiten erkennen lassen, und so erlauben, von der Integration abhängige Ereignisse von solchen, die zufällig parallel abgelaufen sind, zu trennen. Solche Untersuchungen sind derzeit im Gange.

GC-Cluster sind ausschließlich in AT-reichen (vor allem intergenischen Bereichen) Sequenzen lokalisiert; das 3-fach Cluster im 3'-Bereich von bI3 macht hiervon keine Ausnahme. Ursache für diese Präferenz könnte sein, daß das Aufschmelzen der DNA (welches bei AT-reichen Regionen naturgemäß leichter möglich ist) Voraussetzung für die Insertion ist oder alternativ, daß nur AT-reiche Regionen (die meist keine erkennbare Funktion haben) die Insertion von GC-Clustern tolerieren. Die Beobachtung, daß Insertion eines Clusters in den Loop eines bereits vorhandenen Clusters möglich ist, beantwortet diese Frage nicht: Die Insertion erfolgt in einen Bereich der möglicherweise auch in doppelsträngiger DNA partiell einzelsträngig vorliegt, da bei Ausbildung der für GC-Cluster typischen Sekundärstruktur relativ viel Bindungsenergie frei wird. Leichte Aufschmelzbarkeit dieser Region ist also gegeben. Immerhin zeigt die Benutzung des "TAG" innerhalb des Loops des GC-Clusters, daß die umgebenden Bereiche (Sequenzen) offenbar nur geringe Bedeutung für die Erkennung als "target-site" besitzen, da diese im vorliegenden Fall sicherlich komplett andere sind, als innerhalb AT-reicher Regionen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Abelson, J. (1979) RNA processing and the intervening sequence problem. *Ann. Rev. Biochem.* 48, 1035-1069.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., De Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R. and Young, I.G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465.
- Ansorge, W. and de Maeyer, L. (1980) Thermally stabilized very thin (0.02-0.3mm) polyacrylamide gels for electrophoresis. *Journal of Chromatography* 202, 45-53.
- Ansorge, W. and Barker, R. (1984) System for DNA sequencing with resolution of up to 600 base pairs. *J. Biochem. Biophys. Methods* 2, 33-48.
- Anziano, P.Q., Hanson, D.K., Mahler, H.R. and Perlman, P.S. (1982) Functional domains in introns: Trans-acting and cis-acting regions of intron 4 of the cob gene. *Cell* 30, 925-932.
- Bechman, H., Haid, A., Schweyen, R.J., Mathews, S. and Kaudewitz, F. (1981) Expression of the "split gene" COB in yeast mtDNA - translation of intervening sequences in mutant strains. *J. Biol. Chem.* 256, 3525-3531.
- Bernardi, G. (1979) The petite mutation in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 4, 197-201.
- Bertrand, H., Bridge, P., Collins, R.A., Garriga, G. and Lambowitz, A.M. (1982) RNA splicing in *Neurospora* mitochondria. Characterization of new nuclear mutants with defects in splicing the mitochondrial large rRNA. *Cell* 29, 517-526.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Bonitz, S.G., Coruzzi, G., Thalenfeld, B.E., Tzagoloff, A. and Macino, G. (1980) Assembly of the mitochondrial membrane system - structure and nucleotide sequence of the gene coding for subunit 1 of yeast cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 255, 11927-11941.
- Bonitz, S.G., Berlan, R., Coruzzi, G., Li, M., Macino, G., Nobrega, F.G., Nobrega, M.P., Thalenfeld, B.E. and Tzagoloff, A. (1980) Codon recognition rules in yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3167-3170.
- Breathnach, R. and Chambon, P. (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 50, 349-383.

Brody, E. and Abelson, J. (1985) The "Spliceosome": Yeast pre-messenger RNA associates with a 40S complex in a splicing-dependent reaction. *Science* **228**, 963-967.

Burke, J.M. and RajBhandary, U.L. (1982) Intron within the large rRNA gene of *N. crassa* mitochondria: A long open reading frame and a consensus sequence possibly important in splicing. *Cell* **31**, 509-520.

Cech, T.R., Zaug, A.J. and Grabowski, P.J. (1981) In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: Involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* **27**, 487-496.

Cech, T.R., Tanner, N.K., Tinoco, T., Weir, B.R., Zuker, M. and Perlman, P.S. (1983) Secondary structure of the *Tetrahymena* ribosomal RNA intervening sequence: Structural homology with fungal mitochondrial intervening sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3903-3907.

Cech, T.R. (1983) RNA Splicing: Three themes with variations. *Cell* **34**, 713-716.

Chu, F.K., Maley, G.F., Maley, F. and Belfort, M. (1984) Intervening sequence in the thymidylate synthase gene of bacteriophage T4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 3049-3053.

Citterich, M.H., Morelli, G. and Macino, G. (1983) Nucleotide sequence and intron structure of the apocytochrome b gene of *Neurospora crassa* mitochondria. *EMBO Journal* **2**, 1235-1242.

Claisse, M.L., Spyridakis, A., Wambier-Kluppel, M.L., Pajot, P. and Slonimski, P.P. (1978) in Bacila, M., Horecker, B.L. and Stoppani, O.M. (eds.), *Biochemistry and Genetics of Yeast*, Academic Press, NY, pp.368-390.

Cobon, G.S., Beilharz, M.W., Linnane, A.M. and Nagley, P. (1982) Biogenesis of Mitochondria: Mapping of transcripts from the *oli2* region of mitochondrial DNA in two grande strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genetics* **5**, 97-107.

Conde, J. and Fink, G.R. (1976) A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective for nuclear fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73**, 3651-3655.

Davies, R.W., Waring, R.B., Ray, J.A., Brown, T.A. and Scazzocchio, C. (1982) Making ends meet: a model for RNA splicing in fungal mitochondria. *Nature* **300**, 719-724.

De la Salle, H., Jacq, C. and Slonimski, P.P. (1982) Critical sequences within mitochondrial introns: Pleiotropic mRNA maturase and cis-dominant signals of the box intron controlling reductase and oxidase. *Cell* **28**, 721-732.

- Dujardin, G., Pajot, P., Groudinsky, O. and Slonimski, P.P. (1980) Long range control circuits within mitochondria and between nucleus and mitochondria. I. Methodology and phenomenology of suppressors. *Mol. Gen. Genet.* 172, 469-482.
- Dujardin, G., Jacq, C. and Slonimski, P.P. (1982) Single base substitution in an intron of oxidase gene compensates splicing defects of the cytochrome b gene. *Nature* 298, 628-632.
- Dujon, B. (1980) Sequence of the intron and flanking exons of the mitochondrial 21S rRNA gene of yeast strains having different alleles at the *w* and *rib-1* loci. *Cell* 20, 185-197.
- Dujon, B. and Blanc, H. (1980) Yeast mitochondria minilysates and their use to screen a collection of hypersuppressive ρ^- mutants. In: *The Organisation and expression of the mitochondrial genome*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press (A.M. Kroon and C. Saccone, editors), 33-37.
- Dujon, B. (1981) Mitochondrial genetics and functions. In: *The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Life and inheritance* (Strathern, J., Jones, E.W., Broach, J.R., eds.) Cold Spring Harbor Laboratories, 505-635.
- Faugeron-Fonty, G. and Goyon, C. (1985) Polymorphic variations in the *oci* sequences from the mitochondrial genomes of different wild-type yeast strains. *Curr. Genetics*, in press.
- Faye, G., Fukuhara, H., Grandchamp, C., Lazowska, J., Michel, F., Casey, J., Stetz, G.S., Locker, J., Rabinowitz, M., Bolotin-Fukuhara, M., Coen, D., Deutsch, J., Dujon, B., Netter, P., Slonimski, P.P. (1973) Mitochondrial nucleic acids in the petite colony mutants: deletions and repetitions of genes. *Biochimie* 55, 779-792.
- Faye, G. and Simon, M. (1983) Analysis of a yeast nuclear gene involved in the maturation of mitochondrial pre-messenger RNA of the cytochrome oxidase subunit I. *Cell* 32, 77-87.
- Gargouri, A., Lazowska, J. and Slonimski, P.P. (1983) DNA-splicing of introns in the gene: a general way of reverting intron mutations. In: *Mitochondria 1983* (Schweyen, R.J., Wolf, K. and Kaudewitz, F., Eds.), Walter de Gruyter, Berlin-New York 259-268.
- Garriga, G. and Lambowitz, A.M. (1984) RNA splicing in *Neurospora* mitochondria: Self-splicing of a mitochondrial intron in vitro. *Cell* 38, 631-642.
- Grabowski, P.J., Seiler, S.R. and Sharp, P.A. (1985) A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* 42, 345-353.
- Greer, C.L. and Abelson, J. (1984) RNA splicing: rearrangement of RNA sequences in the expression of split genes. *Trends Biochem. Sci.* 2, 139-141.

Grosch,G., Schmelzer,C. and Mathews,S. (1981) Physical map of the COB region in mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genetics* **3**, 65-71.

Haid,A., Grosch,G., Schmelzer,C., Schweyen,R.J. and Kaudewitz,F. (1980) Expression of the split gene COB in yeast mtDNA. *Curr. Genetics* **1**, 155-161.

Helmer Citterich,M., Morelli,G. and Macino,G. (1983) Nucleotide sequence and intron structure of the apocytochrome b gene of *Neurospora crassa* mitochondria. *EMBO Journal* **8**, 1235-1242.

Henikoff,S. (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates breakpoints for DNA sequencing. *Gene* **28**, 351-359.

Hensgens,L.A.M., Bonen,L., de Haan,M., van der Horst,G. and Grivell,L.A. (1983) Two intron sequences in yeast mitochondrial COX1 gene: Homology among URF-containing introns and strain-dependent variation in flanking exons. *Cell* **32**, 379-389.

Hong,G.F. (1982) A systematic DNA sequencing strategy. *J.Mol. Biol.* **158**, 539-549.

Hu,N. and Messing,J. (1982) The making of strand-specific M13 probes. *Gene* **17**, 271-277.

Hudspeth,M.E.S., Ainley,W.M., Shumard,D.S., Butow,R.A. and Grossman,L.T. (1982) Location and structure of the var1 Gene of yeast mitochondrial DNA: Nucleotide sequence of the 40.0 allele. *Cell* **30**, 617-626.

Inoue,T. and Cech,T.R. (1985) Secondary structure of the circular form of the *Tetrahymena* rRNA intervening sequence: A technique for RNA structure analysis using chemical probes and reverse transcriptase. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **82**, 648-652.

Jacq,C., Pajot,P., Lazowska,J., Dujardin,G., Claisse,M., Groudinski,O., de la Salle,H., Grandchamp,C., Labouesse,M., Gargouri,A., Guiard,B., Spyridakis,A., Dreyfus,M. and Slonimski, P.P. (1982) Role of introns in the yeast cytochrome-b gene: Cis- and trans-acting signals, intron manipulation, expression, and intergenic communications. In: *Mitochondrial genes* (ed. P.P. Slonimski, P.Borst and G.Attardi), 155-183, Cold Spring Harbor Laboratory

Jacquier,A. and Dujon,B. (1985) An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. *Cell* **41**, 383-394.

Johnson,J.D., Ogden,R., Johnson,P., Abelson,J., Dembeck,P. and Itakura,K. (1980) Transcription and processing of a yeast tRNA gene containing a modified intervening sequence. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **77**, 2564-2568.

Kaine,B.P., Gupta,R. and Woese,C.R. (1983) Putative introns in tRNA genes of prokaryotes. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **80**, 3309-3312.

- Keller, W. (1984) The RNA-Lariat: A new ring to the splicing of mRNA precursors. *Cell* 32, 423-425.
- Keller, M. and Michel, F. (1985) The introns of the *Euglena gracilis* chloroplast gene which codes for the 32-kDa protein of photosystem II. *FEBS Letters* 172, 69-78.
- Konarska, M.M., Padgett, R.A. and Sharp, P.A. (1985) Trans splicing of mRNA precursors in vitro. *Cell* 42, 165-171.
- Kreike, J., Bechmann, H., van Hemert, F.J., Schweyen, R.J. Boer, P.H., Kaudewitz, F. and Groot, G.P.S. (1979) The identification of apocytochrome b as a mitochondrial gene product and immunological evidence for altered apocytochrome b in yeast strains having mutations in the COB region of mitochondrial DNA. *Eur.J.Biochem.* 101, 607-617.
- Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E. and Cech, T.R. (1982) Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31, 147-157.
- Kurjan, J., Hall, B.D., Gillam, S. and Smith, M. (1980) Mutations at the yeast SUP4 tRNA^{arg} locus: DNA sequence changes in mutants lacking suppressor activity. *Cell* 20, 701-709.
- Lamouroux, A., Pajot, P., Kochko, A., Halbreich, A. and Slonimski, P. P. (1980) Cytochrome b messenger RNA maturase encoded in an intron regulates the expression of the split gene: II. Trans and cis-acting mechanisms of mRNA splicing. In: The organization and expression of the mitochondrial genome (ed. A.M.Kroon and C.Saccone), 153-156. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Lancashire, W.E. and Mattoon, J.R. (1979) Cytoduction: A tool for mitochondrial genetic studies in yeast. *Mol.Gen.Genet.* 170, 333-344.
- Lang, B.F. and Kaudewitz, F. (1982) Cytochrome c₁-deficient mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr.Genet.* 6, 229-235.
- Lang, F.B. (1984) The mitochondrial genome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: highly homologous introns are inserted at the same position of the otherwise less conserved cox1 genes in *Schizosaccharomyces pombe* and *Aspergillus nidulans*. *EMBO Journal* 3, 2129-2136.
- Lazowska, J., Jacq, C. and Slonimski, P.P. (1980) Sequence of introns and flanking exons in wildtype and box3 mutants of cytochrome b reveals an interlaced splicing protein coded by an intron. *Cell* 22, 333-348.
- Lazowska, J., Jacq, C. and Slonimski, P.P. (1981) Splice points of the third intron in the yeast mitochondrial cytochrome b gene. *Cell* 27, 12-14.

Lerner, M.R., Boyle, J.A., Mount, S.M., Wolin, S.L. and Steitz, J.A. (1980) Are snRNPs involved in splicing? *Nature* **283**, 220-223.

Macreadie, I.G., Scott, R.M., Zinn, A.R. and Butow, R.A. (1985) Defective splicing of mitochondrial rRNA in cytochrome-deficient nuclear mutants of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 2635-2639.

Mahler, H.R. (1983) *Int Rev Cytology* **82**, 1-98

Manella, C.A., Collins, R.A., Green, M.R. and Lambowitz, A.M. (1979) Defective splicing of mitochondrial rRNA in cytochrome-deficient nuclear mutants of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 2635-2639.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Meth. Enzymol.* **65**, 499-560.

McGraw, P. and Tzagoloff, A. (1983) Assembly of the mitochondrial membrane system - characterization of a yeast nuclear gene involved in the processing of the cytochrome b pre-mRNA. *J. Biol. Chem.* **258**, 9459-9468.

McGraw, P. and Tzagoloff, A. (1983) Assembly of the mitochondrial membrane system - characterization of a yeast nuclear gene involved in the processing of the cytochrome b pre-mRNA. *J. Biol. Chem.* **258**, 9459-9468.

Messing, J., Crea, R. and Seeburg, P.H. (1981) A system for shotgun DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* **2**, 309-321.

Messing, J. (1983) New M13 vectors for cloning. In: Wu, R., Grossman, L. and Moldave, K. (Eds.), *Methods in Enzymology* **101**, Academic Press, New York, 20-78.

Michel, F., Jacquier, A. and Dujon, B. (1982) Comparison of fungal mitochondrial introns reveals extensive homologies in RNA secondary structure. *Biochimie* **64**, 867-881.

Michel, F. and Dujon, B. (1983) Conservation of RNA secondary structures in two intron families including mitochondrial-, chloroplast- and nuclear-encoded members. *EMBO J.* **2**, 33-38.

Michel, F. (1984) A maturase-like coding sequence downstream of the OX12 gene of yeast mitochondrial DNA is interrupted by two GC clusters and a putative end-of-messenger signal. *Curr. Gen.* **8**, 307-317.

Michel, F. and Lang, F. (1985) Mitochondrial class II introns encode proteins related to the reverse transcriptases of retroviruses. *Nature* **316**, 641-642.

Michel, F. and Cummings, D.J. (1985) Analysis of class I introns in a mitochondrial plasmid associated with senescence of *Podospora anserina* reveals extraordinary resemblance to the *Tetrahymena* ribosomal intron. *Curr.Genet.* **10**, 69-79.

Muller, W. and Gautier, F. (1975) Interactions of heterochromatic compounds with nucleic acids. *Eur.J.Biochem.* **54**, 385-394.

Nargang, F.E., Bell, J.B., Stohl, L.L. and Lambowitz, A.M. (1984) The DNA sequence and genetic organization of a *Neurospora* mitochondrial plasmid suggest a relationship to introns and mobile elements. *Cell* **38**, 441-453.

Netter, P., Jacq, C., Carignani, G. and Slonimski, P.P. (1982) Critical sequences within mitochondrial introns: Cis-dominant mutations of the "Cytochrome-b-like" intron of the oxidase gene. *Cell* **28**, 733-738.

Netzker, R., Kochel, H.G., Basak, N. and Kuntzel, H. (1982) Nucleotide sequence of *Aspergillus nidulans* mitochondrial genes coding for ATPase subunit 6, cytochrome oxidase subunit 3, seven unidentified proteins, four tRNAs and L-rRNA. *Nucleic Acids Res.* **10**, 4783-4794.

Nobrega, F.G. and Tzagoloff, A. (1980) Assembly of the mitochondrial membrane system - DNA sequence and organization of the cytochrome b gene in *Saccharomyces cerevisiae* D273-10b. *J.Biol. Chem.* **255**, 9828-9837.

Norlander, J., Kempe, T. and Messing, J. (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* **26**, 101-106.

Osiewacz, H.D. and Esser, K. (1984) The mitochondrial plasmid of *Podospora anserina*: A mobile intron of a mitochondrial gene. *Curr. Genetics* **8**, 299-305.

Padgett, R.A., Mount, S.M., Steitz, J.A. and Sharp, P.A. (1983) Splicing of messenger RNA precursors is inhibited by antisera to small nuclear ribonucleoprotein. *Cell* **35**, 101-107.

Peacock, A.C. and Dingman, C.W. (1967) Resolution of multiple ribonucleic acid species by polyacrylamid gel electrophoresis. *Biochemistry* **6**, 1818-1827.

Perea, J. and Jacq, C. (1985) Role of the 5' hairpin structure in the splicing accuracy of the fourth intron of the yeast COB-BOX gene. *EMBO-Journal*, in the press.

Pillar, T., Lang, B.F., Steinberger, I., Vogt, B. and Kaudewitz, F. (1983) Expression of the "Split Gene" cob in yeast mtDNA - nuclear mutations specifically block the excision of different introns from its primary transcript. *J.Biol.Chem.* **258**, 7954-7959.

Putrament, A., Baranowska, H. and Prazmo, W. (1973) Induction by manganese of mitochondrial antibiotic resistance mutations in yeast. *Mol. Gen. Genet.* **126**, 357-366.

Raymond, G.J. and Johnson, J.D. (1983) The role of non-coding sequences in transcription and processing of a yeast tRNA. *Nucl. Acids Res.* **11**, 5969-5988.

Rigby, P.W., Dieckman, M., Rhodes, C., Berg, P. (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**, 237-251.

Rogers, J. and Wall, R. (1980) A mechanism for RNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1877-1879.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.

Sanger, F., Coulson, A.R., Barrell, B.G., Smith, A.J.H. and Roe, B.A. (1980) Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J. Mol. Biol.* **143**, 161-178.

Schmelzer, C., Haid, A., Grosch, G., Schweyen, R.J. and Kaudewitz, F. (1981) Pathways of transcript splicing in yeast mitochondria - mutations in intervening sequences of the split gene COB reveal a requirement for intervening sequence-encoded products. *J. Biol. Chem.* **256**, 7610-7619.

Schmelzer, C., Schmidt, C., May, K. and Schweyen, R.J. (1983) Determination of functional domains in intron b11 of yeast mitochondrial RNA by studies of mitochondrial mutations and a nuclear suppressor. *EMBO J.* **2**, 2047-2052.

Slonimski, P., Pajot, P., Jacq, C., Foucher, M., Perrodin, G., Kochko, A. and Lamouroux, A. (1978) Mosaic organization and expression of the mitochondrial DNA region controlling cytochrome c reductase and oxidase. I. Genetic, physical and complementation maps of the box region. In *Biochemistry and Genetics of Yeasts: Pure and Applied Aspects*, M. Bacila, B.L. Horecker and A.M. Stoppani, eds. (New York: Academic Press), pp. 339-368.

Sor, F. and Fukuhara, H. (1982) Nature of an inserted sequence in the mitochondrial gene coding for the 15S ribosomal RNA of yeast. *Nucleic Acids Res.* **10**, 1625-1633.

Sor, F. and Fukuhara, H. (1983) Complete DNA sequence coding for the large ribosomal RNA of yeast mitochondria. *Nucleic Acids Res.* **11**, 339-348.

Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **28**, 503-517.

Tabak,H.F., Van der Horst,G., Osinga,K.A. and Arnberg,A.C. (1984) Splicing of large ribosomal precursor RNA and processing of intron RNA in yeast mitochondria. *Cell* 32, 623-629.

Tzagoloff,A., Akai,A. and Needleman,R.B. (1975) Properties of cytoplasmic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with specific lesions in cytochrome oxidase. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 72, 2054-2057.

Van der Horst,G. and Tabak,H.F. (1985) Self-splicing of yeast mitochondrial ribosomal and messenger RNA precursors. *Cell* 40, 759-766.

van der Veen,R., Arnberg,A.C., van der Horst,G., Bonen,L., Tabak,H.F. and Grivell,L.A. (1986) Excised group II introns in yeast mitochondria are lariats and can be formed by self-splicing in vitro. Submitted to *Cell*.

Wallace,D.C. (1982) Structure and evolution of organelle genomes. *Microbiol.Rev.* 46, 208-240.

Waring,R.B., Davies,R.W., Scazzocchio,C. and Brown,T.A. (1982) Internal structure of a mitochondrial intron of *Aspergillus nidulans*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 79, 6332-6336.

Waring,R.B. and Davies,R.W. (1984) Assessment of a model for intron RNA secondary structure relevant to RNA self-splicing - a review. *Gene* 28, 277-291.

Waring,R.B., Brown,T.A., Ray,J.A., Scazzocchio,C. and Davies,R.W. (1984) Three variant introns of the same general class in the mitochondrial gene for cytochrome oxidase subunit 1 in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* 3, 2121-2128.

Waring,R.B., Ray,J.A., Edwards,S.W., Scazzocchio,C. and Davies,R.W. (1985) The *Tetrahymena* rRNA intron self-splices in *E.coli*: In vivo evidence for the importance of key base-paired regions of RNA for RNA enzyme function. *Cell* 40, 371-380.

Weiss-Brummer,B., Guba,R., Haid,A. and Schweyen,R.J. (1979) Fine structure of OXII, the mitochondrial gene coding for subunit II of yeast cytochrome c oxidase. *Curr. Genetics* 1, 75-83.

Weiss-Brummer,B., Rödel,G., Schweyen,R.J. and Kaudewitz,F. (1982) Expression of the split gene *cob* in yeast - evidence for a precursor of a "Maturase" protein translated from Intron 4 and preceding exons. *Cell* 22, 527-536.

Weiss-Brummer,B., Holl,J., Rödel,G., Schweyen,R.J. and Kaudewitz,F. (1983) Processing of yeast mitochondrial RNA: Involvement of intramolecular hybrids in splicing of *cob* intron 4 RNA as revealed by mutation and reversion. *Cell* 33, 195-202.

Weiss-Brummer,B., Huttenhofer,A. and Kaudewitz,F. (1984) Leakiness of termination codons in mitochondrial mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Gen.Genet.* 128, 62-68.

Yang, V.W., Lerner, M.R. Steitz, J.A. and Flint, S.J. (1981) A small nuclear ribonucleoprotein is required for splicing of adenoviral early RNA sequences. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78, 1371-1375.

DANKSAGUNG

An alle Mitarbeiter des Institutes für ihre Hilfsbereitschaft und für nützliche Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt:

- Prof. R. Schweyen für die Anregung und großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.
- Dr. Weiss-Brummer für die Einführung in biochemische Arbeitstechniken und Unterstützung bei Sequenzierungsarbeiten.
- Ingrid Sadler für die Einführung in die M13-Technik.
- Christine Schüller für ihre wertvolle Mitarbeit im Rahmen eines Großpraktikums.
- sowie Cornelia Schmidt, Dr. Gerhard Rödel und Georg Weiller für zeitweilige fruchtbare Zusammenarbeit.

Ein großer Teil der Arbeit wurde von der deutschen Forschungsgemeinschaft finanziert.

Lebenslauf

Jürgen Zimmermann, geb. Holl

geboren am 13. Oktober 1953

in Augsburg

1960-1964 Besuch der Grundschule

1961-1974 Holbein-Gymnasium in Augsburg

1974-1975 Studium der Theaterwissenschaft an der LMU München

1976-1982 Studium der Biologie an der LMU München

1982 Beginn der Dissertationsarbeit bei Prof. Dr. Schweyen
am "Institut für Genetik und Mikrobiologie" der LMU.

